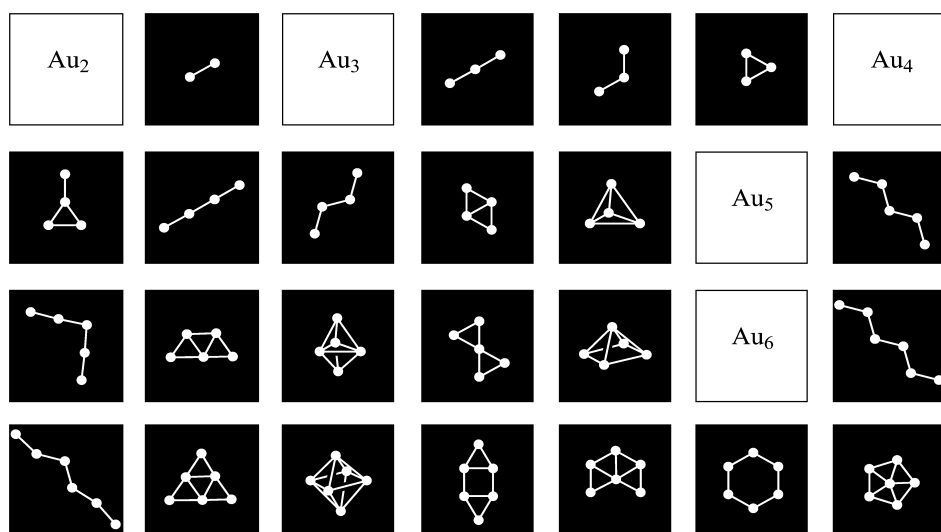


Síntesis, Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos



Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Química
Departamento de Química Orgánica



Síntesis, Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos

Memoria que, para optar al grado de Doctor en
Química por la Universidad de Santiago de Compostela,
presenta **Eldara Rodríguez Cobo**
Santiago de Compostela, Mayo 2012

D. M. ARTURO LÓPEZ QUÍNTELA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y DÑA. MERCEDES TORNEIRO ABUÍN, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

CERTIFICAN:

Que la memoria adjunta, titulada “Síntesis, propiedades y funcionalización de clústeres metálicos”, que presenta Dña. Eldara Rodríguez Cobo para optar al grado de Doctor en Química, ha sido realizada bajo su dirección en los departamentos de Química Física y Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela. Considerando que constituye un trabajo de tesis, se autoriza su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide el presente certificado.

En Santiago de Compostela, Mayo de 2012

Fdo. M. Arturo López Quintela

Fdo. Mercedes Torneiro Abuín

*A mi madre y
a la memoria de mi padre*

“La palabra, al final, es el único sistema para codificar los pensamientos -el único medio- que no es fungible, que se niega a disolverse en el torrente devorador de los medios electrónicos”

Neal Stephenson, *En el principio fue la línea de comandos*, 1999

ÍNDICE

Abreviaturas 1

Introducción 9

La nanotecnología: El reto del nuevo siglo 11

- 1. Historia y proyección de la nanotecnología 11*
- 2. ¿Por qué lo “nano” es diferente? 15*
- 3. Propiedades ópticas de los clústeres 21*
- 4. Síntesis de clústeres 22*
- 5. Nano y bio 25*

Objetivos 27

Discusión de Resultados 31

1. Síntesis de clústeres de oro. Método electroquímico 33

- 1.1 Procedimiento general de síntesis 37*
- 1.2 Estudio de las variables de síntesis 41*
- 1.3 Estabilidad y tratamiento post-síntesis 48*
- 1.4 Caracterización de los sólidos obtenidos 54*
- 1.5 Conclusiones 59*

2. Síntesis de clústeres de oro. Método químico 61

- 2.1 Procedimiento general de síntesis 67*
- 2.2 Caracterización 68*
- 2.3 Propiedades magnéticas 76*
- 2.4 Conclusiones 80*

3. Purificación de clústeres mediante HPLC 83

- 3.1 Condiciones y procedimientos generales 85*
- 3.2 Clústeres de oro 88*
- 3.3 Clústeres de plata 95*
- 3.4 Clústeres de cobre 110*
- 3.5 Conclusiones 124*

4. Caracterización de clústeres de oro mediante EM 127

- 4.1 Muestras analizadas 134*
- 4.2 (MA)LDI 135*
- 4.3 ESI 150*

4.4 Conclusiones 155

5. Funcionalización de clústeres de cobalto 157

5.1 Análisis retrosintético y síntesis del ligando 1 160

5.2 Síntesis de clústeres de cobalto 161

5.3 Acoplamiento de los clústeres de cobalto con el ADCB 163

5.4 Conclusiones 167

Parte Experimental 169

Materiales y métodos 171

Procedimientos experimentales 175

1. Síntesis electroquímica de clústeres de oro 175

2. Síntesis química de clústeres de oro 180

3. Purificación de clústeres por HPLC 185

5. Funcionalización de clústeres de cobalto. 261

Bibliografía 267

Epílogo 283

ABREVIATURAS

A	amperio
a st	vibración de tensión asimétrica
Å	angstrom
Abs	absorbancia
Ac	acetato
ADCB	ácido 4-(9-deceniloxy)benzoico
ADN	ácido desoxirribonucleico
AE	afinidad electrónica
AE	análisis elemental
AFM	microscopio de fuerzas atómicas
aq	acuoso
Ar	arilo
ATF	agente de transferencia de fase
atm	atmósfera
c.c.f.	cromatografía en capa fina
CID	disociación inducida por colisión
CLs	clúster
cm	centímetros
D	diámetro
d	doblete
DCTB	2-[(2 <i>E</i>)-3-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-2-metilprop-2-enilideno]malonitrilo
DEAD	azodicarboxilato de dietilo
def	vibración de deformación
DFT	teoría de funcional de densidad

E	energía
E_F	energía de fermi
EI	energía de ionización
Em	emisión
EM	espectrometría de masas
emu	unidades electromagnéticas
E°	potencial normal de reducción
EPR	resonancia paramagnética electrónica
eq	equivalente
ESI	ionización por electrospray
Et	etilo
eV	electronvoltio
Exc	excitación
F	constante de Faraday
FAB	bombardeo con átomos rápidos
fcc	cúbica centrada en las caras
FE	factor de escalado
Fluo	fluorescencia
G	Gauss
<i>g</i>	factor g de Landé
g	gramo
GHz	gigahertzio
H	campo magnético
h	hora
<i>ħ</i>	constante de Plank

HOMO	orbital molecular ocupado más alto
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Hz	hertzio
ip def	vibración de deformación en el plano
IR	infrarrojo
J	julio
<i>J</i>	constante de acoplamiento
K	kelvin
kV	kilovoltio
LDI	ionización por desorción de láser
LTQ	trampa lineal de iones
LUMO	orbital molecular desocupado más bajo
M	peso atómico
m	multiplete
M	concentración molar
m/z	masa/carga
MALDI	desorción/ionización láser asistida por matriz
MeOH	metanol
MHz	megahertzio
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
MRI	imagen por resonancia magnética
N_A	número de Avogadro

NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	nanómetro
ns	nanosegundo
°C	grado centígrado
Oe	oested
OHP	plano exterior de helmholtz
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PD	desorción de plasma
PDA	array de fotodiodos
Ph	fenilo
pm	picómetro
ppm	partes por millón
Q	cuadrupolo
r	radio
Rf	factor de retención
RMN	resonancia magnética nuclear
RX	rayos X
s st	vibración de tensión simétrica
s	segundo
s	singulete
SG	glutation
st	vibración de tensión
STM	microscopio de efecto túnel
T	tesla

t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
TBA	tetrabutilamonio
TEM	microscopía de transmisión electrónica
TGA	análisis termogravimétrico
THA	tetrahexilamonio
THF	tetrahidrofurano
TOA	tetraoctilamonio
Tol	tolueno
TR	tiempo de retención
UA	unidad arbitraria
uma	unidad de masa atómica
UV	ultravioleta
V	voltio
vis	visible
δ	desplazamiento químico
η	sobrepotencial eléctrico
θ	ángulo del rayo incidente de rayos X
χ	susceptibilidad magnética
μ_B	magnetón de Bohr
μl	microlitro
ρ	densidad
λ	longitud de onda

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología: El reto del nuevo siglo

1. Historia y proyección de la nanotecnología¹

“Nanotechnology is related with the development of functional materials, devices and systems through control of matter on the nanometer length scale (1-100 nanometers), and exploitation of novel phenomena and properties (physical, chemical, biological, mechanical, electrical...) at that length scale. For comparison, 10 nanometers is 1000 times smaller than the diameter of a human hair. A scientific and technical revolution has just begun based upon the ability to systematically organize and manipulate matter at nanoscale. Payoff is anticipated within the next 10-15 years.”ⁱ

Son muchas las definiciones de la nanotecnología, aunque quizás la más completa y extendida sea la dada por la NASA en 2002, que incluye todas las tecnologías relacionadas con los sistemas y materiales que entran dentro de la escala nanométrica.

Sin embargo, pese a lo concreto de esta definición existe la opinión de que la nanotecnología no existe como una sola tecnología identificable, ya que muchos de los problemas y sistemas que aborda se han situado durante años en campos como la ciencia de los materiales y la química coloidal y no hay por qué tratar de agruparlos bajo un nuevo concepto. De todas formas lo que es indiscutible es que en los últimos años la palabra “nanotecnología” ha ocupado un lugar importante tanto en el mundo científico como en la vida

ⁱ NASA 2002, <http://www.ipt.arc.nasa.gov/nanotechnology.html>.

cotidiana, hasta el punto de que en el año 2010 fue nombrada como objetivo prioritario por la Unión Europea al incluirla dentro del VI Programa Marco.

En los últimos quince años se han invertido millones de euros en proyectos de investigación por parte de los gobiernos de los países desarrollados, además de haber surgido un gran número de empresas dedicadas al desarrollo y aplicación de nanomateriales, figura 1.

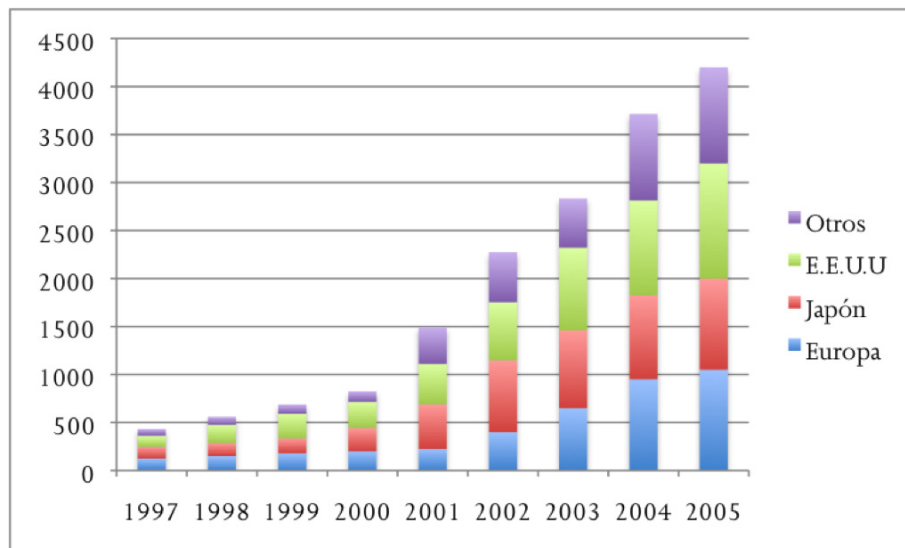


Figura 1. Financiación de la nanotecnología en el mundo (M\$/año) durante el período 1997-2005.²

Haciendo un ejercicio de historia hay que mencionar a Eric Drexler como el primero en acuñar el término “nanotecnología” en su libro “Engines of creation”.³ En sus páginas imagina una tecnología con factorías del tamaño de una célula equipadas con nanomáquinas o ensambladores, como él las llama, capaces de construir cualquier cosa átomo a átomo.

Esta visión tiene su origen por una parte en la biología molecular, con su capacidad de sintetizar y organizar la vida a partir de elementos básicos, como es, por ejemplo, el caso de los ribosomas, que son capaces de sintetizar proteínas complejas mediante las especificaciones del ADN.

Por otra parte, la idea subyacente de esta manipulación de la materia está presente en el discurso dado por Richard Feynman en 1959 en el Caltech.⁴

“There is plenty of room at the botton” y su idea de escribir la enciclopedia británica en la cabeza de un alfiler, se han convertido en las citas más importantes cuando se habla de nanotecnología y de su historia.

“What I want to talk is the problem of manipulating and controlling things on a small scale. Why cannot we write the entire 24 volumes of the Encyclopædia Brittanica on the head of a pin?”

En su discurso Feynman propone la manipulación de la materia átomo a átomo para la construcción de nuevos dispositivos y el almacenaje de información de una forma mucho más eficaz, admitiendo también los problemas que pueden existir al trabajar en esta escala, pero, como él dice:

“The principles of physics, as far as I can see, do not speak against the possibility of maneuvering things atom by atom”

En la década de los 60 Feynman ya propone algo que ahora tenemos cerca de nosotros como son las numerosas aplicaciones que a día de hoy existen dentro del campo de la nanotecnología.

“... although it is a very wild idea, it would be interesting in surgery if you could swallow te surgeon.”

Aunque no fueron ni Feynman ni Drexler quienes inventaron la nanociencia ni las nanopartículas, existen ejemplos de manipulación de la materia a esas escalas desde tiempos anteriores a la revolución industrial, en las vidrieras de las catedrales, cuyos colores son debidos a partículas de oro y plata en suspensión o también en las tintas usadas por los egipcios.

El primer ejemplo de nanopartículas publicado data de 1847, cuando Michael Faraday describió las propiedades ópticas de un sistema coloidal de oro sintetizado usando tetracloroaurato y fósforo blanco.⁵

“Part of the gold is reduced in exceedingly fine particles, which becoming diffused, produce a beautiful ruby fluid”

Sin embargo, la revolución vino del hecho de llevar adelante esta tecnología de forma consciente, lo que abrió la veda para el desarrollo de nuevas técnicas para la síntesis, manipulación y aplicación de este nuevo orden de la materia.

Como ya predijera Feynman, lo que realmente propició el desarrollo de la nanotecnología fue la invención de instrumentos que nos permitieran ver a esa escala a presión atmosférica (pues el microscopio electrónico permite resolución atómica pero necesita condiciones de alto vacío), ya que al fin y al cabo ver es crear. Los microscopios AFM/STM (1986) que permitieron “tocar” y “ver” superficies nanoestructuradas en condiciones ambientales, fueron desarrollados por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer y en ese mismo año recibieron el premio Nobel de Química.⁶

El siguiente hito podemos situarlo en 1989 cuando D. M. Eigler *et al.* ilustraron el primer ejemplo de manipulación atómica escribiendo “IBM” con 36 átomos de xenón en una superficie de níquel, tal como se puede observar en la figura 2.⁷ Este hecho abrió la posibilidad de transportar átomos en una superficie situando la punta del STM cerca de un átomo, para construir estructuras artificiales a escala atómica.

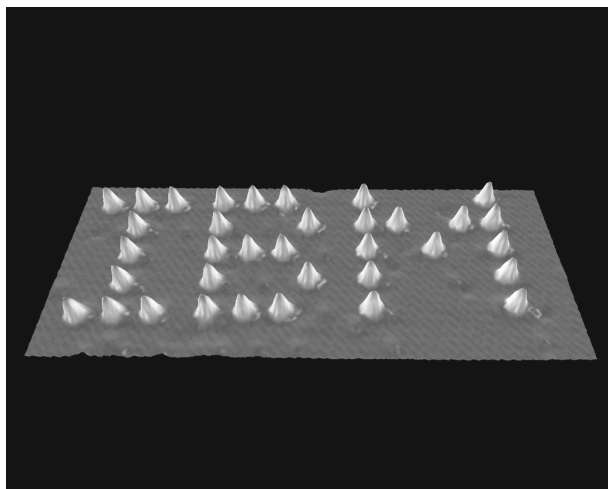


Figura 2. Letras (IBM) escritas con 36 átomos de xenón sobre una superficie de níquel mediante STM.

Aunque pueda parecer que la nanotecnología es un campo muy especializado realmente se trata de todo lo contrario. Los retos que suponen el avance de esta

tecnología no se pueden abordar por un sólo especialista, si no que requiere la colaboración de físicos, químicos, biólogos, ingenieros, médicos, etc. Así que un concepto importante en este campo es la multidisciplinariedad y esto se extiende también a las aplicaciones presentes y futuras.

Las aplicaciones de la nanotecnología se pueden encontrar en campos tan variados como los de la medicina; farmacia, tanto en las etapas de diagnóstico como en la administración de fármacos; ingeniería de tejidos; nuevos sistemas para el tratamiento de aguas; en la informática, tanto en el almacenamiento de información, como en el desarrollo de materiales semiconductores más eficientes; en el desarrollo de sistemas optoelectrónicos o computadores cuánticos; en el desarrollo de nuevos materiales mejorados para la construcción, en recubrimientos, vidrios, etc.; en el campo de los catalizadores; en las industrias de consumo y alimentación; en la fabricación de tejidos y materiales inteligentes; en el campo de los cosméticos; en la agricultura; etc.

2. ¿Por qué lo “nano” es diferente?

El prefijo “nano” denota el factor 10^{-9} de una unidad y tiene su origen en la palabra griega “nanos” que significa enano.

Este es el régimen de tamaño entre las moléculas o átomos, y la materia condensada. Normalmente, cuando se habla en términos de moléculas o materia condensada, las propiedades se pueden variar mediante el cambio en la composición y la estructura; sin embargo, en la escala nanométrica es suficiente con la variación en el tamaño para que se produzcan cambios importantes en las propiedades conservándose la composición. Así que la nanotecnología consiste en mucho más que en reducir la materia a un tamaño nanométrico, pasando de “macro” o “micro” a “nano”. Este hecho es debido a que el tamaño de los nanoobjetos entra dentro de la magnitud de la longitud de onda de De Broglie y, como consecuencia, los estados están cuantizados, por lo que muchos de los efectos que ocurren en esta escala no se pueden describir con las leyes de la mecánica clásica, entrando en el régimen de la mecánica cuántica.

El movimiento brownianoⁱⁱ se hace más importante al reducir la escala de los objetos a estudiar, así que es un factor a tener en cuenta a la hora de trabajar en este régimen de tamaños. Por una parte, cuanto más grande sea la diferencia de tamaños entre el objeto en disolución y las moléculas del medio, más grande es el efecto de una sola colisión. Por otra parte, el número de colisiones promedio en las distintas direcciones del espacio tenderá a ser mayor al aumentar el número de colisiones. Como consecuencia de estos dos hechos, cuanto más pequeña sea una partícula más grande será el efecto del movimiento browniano. El resultado de esto será que mientras las partículas más pequeñas se verán sometidas al constante empuje por la colisión con las moléculas del disolvente, provocando que se muevan de un lado a otro de forma errática, las partículas más grandes navegan de una forma mucho más suave por el medio. Esto se podría resumir diciendo que las cosas pequeñas van rápido pero no llegan muy lejos.¹

Otro concepto importante a tener en cuenta es la mayor reactividad de los materiales finamente divididos debido a su mayor relación superficie/volumen, que se vuelve extremadamente importante en la nanoescala, provocando que los nanoobjetos o nanopartículas tiendan a agregarse fácilmente para disminuir su energía superficial. Por tanto, a la hora de trabajar con este tipo de sistemas es importante contar con estrategias para evitar este efecto. Normalmente estas estrategias suelen implicar el recubrimiento con moléculas o polímeros que estabilizan las nanopartículas mediante impedimento estérico o repulsión electrostática.

Las nanopartículas más estudiadas son de materiales metálicos (como el oro, la plata o el cobalto), de materiales semiconductores (como los calcogenuros de cadmio, arseniuro de galio o fosfuro de indio) o de materiales aislantes (como el óxido de hierro o de titanio). En general se considera que los nanomateriales han de ser cristalinos y de un tamaño y forma lo más monodispersa posible.⁸ Aunque la forma más común es la esférica también hay geometrías más complejas como hilos, cilindros o prismas que se pueden sintetizar de forma controlada.^{9, 10}

ⁱⁱ Movimiento aleatorio que se observa en algunas partículas microscópicas que se hallan en un medio fluido, cuyo nombre se debe a Robert Brown. Este movimiento aleatorio se debe a que su superficie es bombardeada incesantemente por las moléculas del fluido sometidas a una agitación térmica.

Las nanopartículas de metales nobles se han convertido en uno de los tipos de nanomateriales más importantes en nanociencia y de la investigación en nanotecnología. De entre todos los metales el oro es uno de los más estudiados en nanotecnología. El oro coloidal se conoce desde la antigüedad, así que la síntesis de nanopartículas de oro es una de las que se encuentra más avanzada. Sus propiedades ópticas y eléctricas hacen de estas partículas un buen candidato para numerosas aplicaciones dentro del campo de la biología o la medicina.^{11, 12}

El oro es un metal químicamente inerte y normalmente se considera un catalizador pobre. Sin embargo, cuando se encuentra formando parte de agrupaciones inferiores a los 10 nm y se deposita sobre óxidos metálicos o carbón activo se vuelve sorprendentemente activo para muchas reacciones como la oxidación del monóxido de carbono o la epoxidación del propileno. Otro de los aspectos que más llama la atención a primera vista son los colores que presentan las nanopartículas de oro como resultado de la banda plasmónica superficial. El oro metálico presenta un color amarillo con el típico brillo de los metales; sin embargo, las nanopartículas de oro de distintos tamaños y formas pueden presentar toda la gama de colores del espectro visible.¹³⁻¹⁶

“We live in the macroworld, we have mature technologies that operate in the microworld, and we are beginning our discovery of the nanoworld. Are there any worlds on even smaller scales that remain to be exploited?”

En 2004 en su libro “Soft Machines” Richard A. L. Jones se pregunta si existe alguna escala por debajo de la nanométrica que pueda sorprendernos.¹ La respuesta a esta pregunta ha resultado afirmativa casi diez años más tarde con la aparición de un nuevo régimen, situado justamente entre las nanopartículas y los átomos: los clústeres atómicos subnanométricos. Las moléculas más pequeñas están formadas por tan sólo unos cuantos átomos, así que su tamaño está en torno al nanómetro. Es, pues, el tamaño de estas pequeñas moléculas el que define el límite inferior del nanomundo y es precisamente en este límite donde se encuentran los clústeres.

El término clúster fue usado por primera vez por Cotton para designar

compuestos con enlaces metal-metal y en un número suficiente de átomos para definir una estructura poliédrica en tres dimensiones.¹⁷ Así que los primeros ejemplos de clústeres de oro se encuentran relacionados con la química organometálica. Aunque no se trate de un concepto nuevo en la historia de la química, la novedad de los clústeres atómicos subnanométricos reside en el hecho de que todos los átomos del metal se encuentran en estado de oxidación cero, en contraste con los estados de oxidación de los clústeres clásicos.

Los clústeres atómicos consisten en agrupaciones de átomos con composiciones bien definidas y que cuentan con tan sólo unas pocas estructuras geométricas estables, lo que supone una primera diferencia con respecto a las nanopartículas y una mayor similitud a las moléculas. Después de los átomos, los clústeres atómicos constituyen las “piezas atómicas” más elementales de la naturaleza y se caracterizan porque su tamaño es comparable a la longitud de onda de Fermi del electrón, lo que los convierte en el puente entre los átomos y las nanopartículas con propiedades que difieren mucho de los dos regímenes.

Mientras que las nanopartículas metálicas típicas presentan una dependencia suave del tamaño con respecto a las propiedades, cuando el tamaño de la partícula se vuelve comparable a la longitud de onda de Fermi de un electrón (~ 0.52 nm para el oro y la plata) las propiedades del clúster metálico resultan ser muy diferentes de las que se esperarían tan sólo debido a su alta relación superficie/volumen y se asemejan más a las encontradas en las moléculas. En estas especies de tipo molecular los efectos cuánticos son los responsables de sus propiedades químicas, ópticas y electrónicas como por ejemplo, magnetismo, fotoluminiscencia y actividades foto- y electro- catalíticas.^{15, 18-20} Con respecto a la actividad catalítica, en contraste con la inercia mostrada por las superficies metálicas de oro, catalizan de forma eficaz toda una serie de reacciones químicas, como por ejemplo, la oxidación del monóxido de carbono, siendo en este caso el clúster de ocho átomos de oro el más activo de los clústeres.¹⁴

Los efectos cuánticos en los clústeres se manifiestan por la desaparición de la banda plasmónica superficial, típica -como hemos mencionado- de los vistosos colores que presentan las nanopartículas.. Esta desaparición indica que

los electrones de conducción están ahora “enlazados” y el metal pierde así su carácter metálico. Otra propiedad muy interesante que se deriva de este diferenciado comportamiento electrónico es la fluorescencia. Son muchos los ejemplos publicados hasta el momento de clústeres de oro fluorescentes con diferentes longitudes de onda de emisión y excitación.^{18, 19, 21-26} Esto los hace potenciales marcadores en biotecnología, mucho más interesantes que los “quantum dots” de semiconductores clásicos como, por ejemplo, CdSe/ZnS que contienen metales tóxicos y presentan ventajas adicionales sobre los marcadores fluorescentes orgánicos, como son menor “photobleaching” y que se pueden modular sus longitudes de onda de excitación y emisión variando el tamaño.

Otra diferencia importante de los clústeres frente a las nanopartículas está en que la presencia o ausencia de un sólo átomo puede producir un cambio muy apreciable en las propiedades del clúster. Por ejemplo, se sabe desde la década de los 80, cuando se investigaron las propiedades de los clústeres en fase gaseosa, que ciertos clústeres son más estables que otros,²⁷ correspondiendo esta estabilidad (por ejemplo, para metales alcalinos M_n con $n=8, 18, 20, 34, 40$, etc.) con la evolución electrónica que lleva a capas cerradas, conociéndose a estos números como “números mágicos”.

Es difícil hacer cálculos precisos de la estructura electrónica de los clústeres metálicos, sobre todo para el caso de los clústeres de mayor tamaño cuando están en disolución y protegidos por una capa de ligandos. Esta dificultad se puede evitar usando modelos sencillos como el modelo del Jellium, desarrollado inicialmente para clústeres en fase gas.

En este modelo el clúster se reemplaza por una estructura electrónica en capas que consiste en un “jellium”ⁱⁱⁱ esférico cargado positivamente rodeado de los electrones de valencia. Se considera que los electrones se mueven en un potencial de campo medio ocupando niveles de energía de acuerdo con el principio de Aufbau. Este modelo representa una buena aproximación ya que preserva la mayor parte de las características fisicoquímicas de los clústeres. La energía total, como función del tamaño del clúster, calculada mediante esta aproximación presenta discontinuidades asociadas a los niveles electrónicos

ⁱⁱⁱ también conocido como UEG (uniform electron gas) o HEG (homogeneous electron gas): gas uniforme y homogéneo de electrones.

lentos y que se corresponden con los clústeres más estables que poseen un número de átomos “mágico” (8, 18, 20, 34, 40, 58, 92, 138, etc. para metales alcalinos o que aporten un electrón a la capa de valencia como la de la plata, el oro, etc.).

En los últimos años se han llevado a cabo estudios teóricos por DFT para determinar las estructuras geométricas de clústeres de oro, plata y mezclas de ambos metales, así como también sus densidades de estados electrónicos. Se ha observado que, por lo general, los resultados obtenidos concuerdan con los datos experimentales y con las aproximaciones utilizadas en el modelo del Jellium.²⁸ De estos estudios se deduce que, por una parte, existe una oscilación en la estabilidad y las propiedades electrónicas de los clústeres en función del número de átomos; siendo más estables en estado neutro los números pares y en estado aniónico los impares. Por otra parte, en el oro la energía del orbital 6s es tan baja como la del 5d, así que la hibridación s-d favorece clústeres de una o dos dimensiones. En este elemento, los clústeres son planos hasta aproximadamente 12 átomos. Sin embargo en la plata se ven favorecidas conformaciones en tres dimensiones con coordinaciones esféricas debido a orbitales de valencia tipo s, por lo que la geometría plana solo se observa hasta aproximadamente 6-8 átomos.

En general los clústeres se pueden dividir en dos tipos, por una parte clústeres grandes, consistentes en un núcleo de entre 20 y 60-100 átomos y una capa protectora de ligandos fuertes como las fosfinas o los tioles. Por otra parte están los clústeres pequeños, formados por un número de átomos menor, aproximadamente entre 2 y 20, que no necesitan ligandos estabilizadores fuertes y que tienen todos sus átomos en la superficie. Ambos tipos de clústeres presentan niveles de energía discretos y un “band-gap”^{iv} que aumenta al disminuir el tamaño.

Existe una clara diferencia entre los clústeres grandes y pequeños: mientras que los clústeres grandes muestran un decrecimiento continuo de la banda de absorción con pequeños hombros similares a la absorción que presentan los semiconductores, los clústeres pequeños presentan bandas de absorción bien definidas indicando un comportamiento tipo molecular.

^{iv} banda de energías prohibida que consiste en la diferencia de energía entre la parte superior de la banda de valencia y la parte inferior de la banda de conducción.

Una consecuencia directa de esta presencia de estados discretos en los clústeres metálicos es la aparición de un “bandgap” HOMO-LUMO similar al de los semiconductores. Este comportamiento se hace particularmente significativo para los clústeres más pequeños con “bandgaps” que superan 2-3 eV.

3. Propiedades ópticas de los clústeres

Es un hecho conocido que la espectroscopía óptica ha sido indispensable para elucidar la estructura electrónica de átomos y moléculas y esto no es menos en el caso de nanopartículas y clústeres.

Para las nanopartículas de metales de transición hay que tener en cuenta la dispersión de luz causada por transiciones interbanda de los electrones d que dan origen a las bandas plasmónicas y sus correspondientes colores, como ya se ha mencionado. Estas transiciones para el cobre y el oro están en el espectro visible y para la plata en el ultravioleta cercano.

Tal como se ha indicado, el modelo del Jellium proporciona una buena aproximación del comportamiento electrónico de los clústeres, describiendo adecuadamente la dependencia de la energía de fotoemisión con el número de átomos del clúster, según la ecuación 1,^{18, 27, 29} donde N es el número de átomos del clúster, E_F la energía de Fermi del metal (5.35 eV en el caso del oro) y E la energía del “band-gap”, o banda de energía prohibida, que se puede aproximar a la banda de emisión en experimentos de fotoluminiscencia:

$$E = E_F / N^{1/3} \quad (1)$$

Con esta sencilla fórmula se está en condiciones de calcular el número de átomos del clúster a partir de su espectro de fotoluminiscencia. Si se quisiera utilizar el máximo del espectro de absorción del clúster (o la longitud de onda a partir de la cual comienza la absorción del clúster, según el caso) para dicho cálculo, es necesario tener en cuenta entonces el desplazamiento de Stokes. Según los resultados de la bibliografía,²¹ este desplazamiento es del orden de 0.5 eV por lo que se puede obtener una relación aproximada entre el máximo de absorción y el número de átomos. La figura 3 representa esta relación para clústeres de oro de dos a 20 átomos.

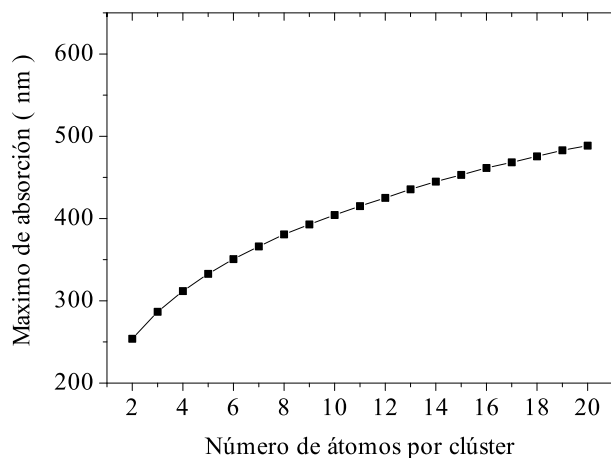


Figura 3. Relación aproximada entre el máximo de absorción y el número de átomos por clúster para un clúster de oro, de acuerdo con el modelo del Jellium y suponiendo un desplazamiento de Stokes de 0.5 eV.

4. Síntesis de clústeres

Como se ha visto, los clústeres se encuentran en un campo que solapa la química organometálica y la nanotecnología y, por lo tanto, los métodos sintéticos tienen que ver con ambas áreas.

Dentro de la química organometálica Werner *et al.* en 1999 hicieron un resumen de las aportaciones más importantes desde que en 1965 Malatesta publicara el primer ejemplo de un clúster de oro.^{30, 31} En general la síntesis de clústeres consiste en la reacción espontánea de un ligando L (normalmente fosfina) con una sal de oro monovalente (AuX) para formar un complejo AuXL. Este mismo complejo se puede preparar también a partir de una sal de oro trivalente (HAuCl₄) mediante su reducción previa a oro monovalente, lo que se consigue fácilmente por medio de la adición de un segundo mol de fosfina que se oxida a óxido de fosfina.

Los clústeres se forman entonces tratando el complejo AuXL con un agente reductor. El resultado de la reacción dependerá del tipo de ligando L, la naturaleza del ión X, el tipo de reductor y en menor medida del disolvente empleado en la síntesis.

En general esta síntesis está basada en la tendencia del oro a formar enlaces metal-metal, también conocida como “aurofilia”.

Los clústeres sintetizados mediante estos métodos son generalmente catiónicos, con lo que incluyen además de Au(0), átomos de Au(I) o Au(III). Cuando realmente los clústeres de oro presentan propiedades interesantes es cuando todos los átomos de oro se encuentran en estado de oxidación cero. La mayor parte de los procedimientos sintéticos para la obtención de clústeres de este tipo tienen el problema de que llevan a la producción de una mezcla de diferentes tipos de clústeres y a menudo el rendimiento para la obtención de un clúster con un número de átomos determinado es muy pequeño, así que los productos tienen que separarse mediante técnicas como la cristalización fraccionada, cromatografía, electroforesis, etc.

Es evidente el problema que esto supone para el desarrollo de aplicaciones que aprovechen al máximo las propiedades de los clústeres, así que es necesario el desarrollo de estrategias sintéticas para la obtención de clústeres de tamaño definido con buenos rendimientos y evitando los tratamientos de separación posteriores a la síntesis.

Cuando se habla de los métodos actuales de síntesis de clústeres, al igual que para las nanopartículas, hay dos aproximaciones: “top-down” y “bottom-up”, o lo que es lo mismo “descendente” y “ascendente”.

En las aproximaciones “top-down” los clústeres se obtienen a partir de precursores grandes como nanopartículas o directamente del oro metálico. Uno de los métodos más comunes consiste en la corrosión de nanopartículas, usando la capacidad corrosiva de algunos ligandos como los tioles, que desplazan los átomos superficiales de las nanopartículas metálicas y las rompen en trozos más pequeños dando lugar a clústeres estables.^{32, 33}

En las aproximaciones “bottom-up” los clústeres se construyen a partir de estructuras más pequeñas como son átomos o iones. Las técnicas usadas en este caso dependerán del tamaño del clúster que se quiera sintetizar.

Ejemplos de estos métodos incluyen la reducción de sales metálicas en presencia de ligandos o encapsuladas en algún tipo de espacio reducido,^{18, 26, 34} métodos electroquímicos o bien mediante el control cinético usando microemulsiones.^{19, 20, 23, 35-37}

Para la síntesis de los clústeres más pequeños es importante el control cinético de la reacción, lo que se consigue mediante el uso de reductores suaves o concentraciones bajas. En general, se cree que la dificultad en la síntesis de clústeres metálicos viene determinada por el estricto control que hay que tener de las condiciones de reacción para conseguir detener la reacción en el momento preciso en que se forman los clústeres de un tamaño de interés determinado.

Es necesario destacar aquí que existe la creencia generalizada de la necesidad de aislar los clústeres una vez que se han sintetizado. Esta creencia, basada en la teoría de nucleación y crecimiento, supone que los núcleos formados durante los primeros pasos de la síntesis química sólo son estables cuando adquieren un tamaño específico conocido como “núcleo crítico”. Por debajo de ese tamaño los núcleos se disolverán debido a su alta presión de Laplace. Sin embargo, por encima de ese tamaño crítico, los núcleos continuarán creciendo para reducir su energía superficial mediante distintos mecanismos como la autocatálisis, maduración de Ostwald, etc. hasta que el crecimiento se pare por la unión con los ligandos presentes en el medio.

Sin embargo, hay que indicar que estos argumentos de nucleación-crecimiento, que normalmente se han aplicado en el caso de nanopartículas -y clústeres de gran tamaño- no son correctos cuando se trata de la formación de clústeres más pequeños. Rodríguez-Sánchez *et al.* encontraron evidencias de la presencia de clústeres de Ag_n ($n \leq 10$) durante todo el proceso de síntesis electroquímico de nanopartículas de plata, que actuaban como precursores de las nanopartículas de mayor tamaño.³⁸ Más tarde estudiaron el mecanismo y la cinética de la formación de nanopartículas de plata electroquímicamente, encontrando que existían clústeres (como el clúster Ag_4^{2+}) que permanecían sin crecer una vez finalizada la reacción, aunque hubiera en el medio nanopartículas o iones. Este hecho indicaba claramente que los clústeres eran estables y no se disolvían ni pasaban a ser “adsorbidos” por las nanopartículas en un proceso de maduración de Ostwald.³⁹ Estos resultados abrían entonces la puerta a un posible control cinético de la reacción para la obtención de clústeres estables de pequeño tamaño.

5. Nano y bio⁴⁰

La química supramolecular implica la investigación de los principios de la naturaleza para producir ensamblajes moleculares complejos y funcionales, así como la utilización de estos principios para generar dispositivos y materiales que se puedan usar como sensores, catalizadores, transportadores y en otras aplicaciones en las ciencias médicas o la ingeniería. La evolución natural ha llevado a ensamblajes altamente funcionales de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas que llevan a cabo tareas complejas, por lo que ya desde hace tiempo se ha intentado emular con mayor o menor éxito esta funcionalidad y especificidad biológica.

Si unimos las potencialidades que ofrece la nanotecnología, con sus novedosos nanomateriales, con la química supramolecular y la biotecnología, nos encontraremos en un campo con un potencial enorme, que permitirá tomar ventajas de las mejoras evolutivas de los componentes biológicos para fabricar nuevos materiales inteligentes, así como también el uso de los nanomateriales avanzados actuales para resolver problemas biológicos, pues, al fin y al cabo, los materiales nanométricos y nanoestructurados y las biomoléculas y biosistemas se encuentran en la misma escala de tamaño. Por ello, las nanopartículas inorgánicas son extremadamente interesantes al poder utilizarse como “ladrillos” para la generación de superestructuras más grandes con potencialidad para emular el ensamblaje de estructuras naturales.

El uso de partículas en ensayos biológicos y otras aplicaciones se remonta a hace varias décadas, siendo los primeros ejemplos de ello las microesferas de látex y las nanopartículas de oro.^{41, 42} Con la irrupción de la nanotecnología, el tamaño de las partículas se redujo en dos o tres órdenes de magnitud y con ello las aplicaciones se expandieron exponencialmente. Debido a las propiedades que presentan las nanopartículas metálicas, han dejado de utilizarse únicamente como un simple método de transporte para convertirse en algo de mayor valor añadido, aportando funcionalidades per se.

A día de hoy las nanopartículas y micropartículas se usan en tests de aglutinación y ensayos, tests de reacción en cadena de la polimerasa (PCR - polymerase chain reaction-), ensayos basados en superparamagnetismo, sistemas de separación magnéticos, biosensores, amplificadores de las señales espectrales de Raman, en ensayos de dispersión de luz y como marcadores

fluorescentes para la detección de moléculas biológicas. Aunque éstos no son más que algunos ejemplos de aplicaciones que ya se encuentran comercializadas, son muchas más las que están siendo estudiadas a nivel laboratorio y que, sin duda, llegarán a convivir con nosotros en los próximos años.

Los tipos de partículas utilizados en este campo son muy variados en composición, forma y tamaño. En el caso de las nanopartículas de oro ya han sido usadas como marcadores de detección para marcadores inmuno-histoquímicos y en ensayos de diagnóstico de flujo lateral. Estas partículas permiten capacidades de muestreo con una sola partícula, lo que resulta de gran interés en aquellos tests que necesiten una gran sensibilidad.

El uso de partículas en este campo implica, sin excepción, el anclaje de ligandos que proporcionen una funcionalidad determinada, ya sea por medio de un enlace covalente o por adsorción pasiva. Esta unión es la que proporciona a la partícula la capacidad de unirse selectivamente a dianas biológicas en mezclas complejas. La afinidad de las partículas se puede usar para separar y aislar proteínas u otras biomoléculas o para detectar de forma específica la presencia de estas dianas en células, secciones de tejidos u otro tipo de muestras biológicas complejas.

Las reacciones usadas para la unión de estos ligandos a las nanopartículas son básicamente las mismas que las usadas para la bioconjugación de moléculas o la inmovilización de ligandos en superficies o soportes cromatográficos. Sin embargo, con las nanopartículas el tamaño puede ser un factor importante a tener en cuenta pues puede suceder que la reacción y su cinética se vean afectadas de forma considerable. Otros factores que también pueden afectar a la reacción son su densidad y su composición superficial. Todos estos factores afectarán a los protocolos de anclaje, sobre todo en las técnicas de manipulación y lavado usadas durante el proceso de conjugación, por lo que cuando se trabaja con nanopartículas se requiere una optimización de las condiciones de síntesis, adecuada para cada tipo de partícula.

OBJETIVOS

Al observar la evolución de la nanotecnología a lo largo de su corta historia queda patente que, aunque se ha recorrido mucho camino a la hora de optimizar los procedimientos sintéticos y entender las propiedades de las nanopartículas, en el caso particular de los clústeres este avance está teniendo lugar en estos momentos y todavía existe la necesidad del desarrollo de nuevos métodos sintéticos que lleven a la obtención de clústeres de pequeño tamaño de composiciones definidas, así como el estudio de las estructuras y las propiedades fisicoquímicas de cada tipo de clústeres. Este conocimiento es imprescindible para poder optimizar el uso de los mismos y conseguir el aprovechamiento de sus propiedades magnéticas, ópticas y catalíticas en aplicaciones tan variadas como las que se han visto a lo largo de la introducción.

Por lo tanto, con el objetivo final enmarcado en el campo de la síntesis y funcionalización de clústeres atómicos subnanométricos de distintos metales, en esta tesis se han abordado los siguientes puntos:

En primer lugar se ha tratado de optimizar y estudiar de forma sistemática la síntesis de clústeres de oro, mediante el control cinético, utilizando dos métodos comunes para la obtención de nanopartículas.

En segundo lugar, se ha procedido a la separación de clústeres de distintos metales mediante la técnica de HPLC.

En tercer lugar, se ha aplicado la técnica de espectrometría de masas MALDI y ESI para la caracterización de los clústeres sintetizados.

Finalmente, se ha puesto a punto la funcionalización de un sistema formado por clústeres grandes de cobalto.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1

Síntesis de clústeres de oro. Método electroquímico

El objetivo de este capítulo es el desarrollo de un método sintético de clústeres pequeños con composiciones definidas, que permitan un estudio detallado de la relación tamaño/propiedades al ir añadiendo átomos a los agregados. Esta relación tamaño/propiedades está claramente establecida en el caso de las nanopartículas y se produce de una forma continua, porque sus propiedades vienen determinadas por la alta relación de átomos en la superficie y en general, la presencia de un átomo más o menos no afectará a las propiedades de la nanopartícula. En el caso de los clústeres esto no es así, ya que las propiedades viene determinadas por el número de átomos concretos que conforman el clúster debido a que la distribución electrónica será diferente en cada caso.

En general, tal como se ha mencionado en la introducción, los métodos químicos de síntesis disponibles siguen dos estrategias, por una parte una aproximación ascendente (bottom-up) basada en la nucleación de átomos de oro y crecimiento en la presencia de tioles o con el uso de moléculas que restrinjan de alguna forma el espacio de crecimiento de la partícula como dendrímeros, ADN, vesículas, etc.^{43, 44} Por otra parte la aproximación descendente (top-down) que consiste en el uso de un agente corrosivo para la degradación nanopartículas grandes.⁴⁵

En esta tesis se propone una aproximación ascendente introducida en nuestro grupo de investigación y basada en el control cinético de la reacción para detener el proceso de formación de partículas en los primeros pasos, consiguiendo así la obtención de clústeres Au_n (siendo $n \leq 20$).⁴⁶

En primera instancia se propone abordar el problema a través de una modificación de la síntesis electroquímica de nanopartículas descrita por Reetz *et al.* en 1994.⁴⁷⁻⁴⁹ El método de Reetz consiste en la disolución anódica de un metal y su posterior reducción en la superficie del cátodo para dar lugar a la formación de partículas metálicas estabilizadas por sales de tetraalquilamonio. Este tipo de síntesis posee la gran ventaja de la alta pureza con que se obtienen las partículas, así como el control del tamaño final de los agregados mediante el control de la densidad de corriente aplicada durante el proceso. Cuanto más alta la densidad de corriente más alto será el sobrepotencial (definido como la desviación del potencial de reducción del potencial de equilibrio) y por tanto el tamaño de partícula será más pequeño, ecuación 2.

$$r_{crit} = \frac{2M\gamma}{nF\eta\rho} \quad (2)$$

donde el radio crítico (r_{crit}) viene determinado por el peso molecular M , la tensión superficial γ , la constante de Faraday F , el sobrepotencial η , la densidad del clúster ρ y la valencia n .

La modificación llevada a cabo en nuestro grupo de investigación por Rodríguez-Sánchez *et al.* extendió el método a otros tipos de metales como plata y cobalto. Se realizó un estudio detallado del efecto de las distintas variables de síntesis sobre el tamaño y morfología de las partículas finales obtenidas.^{38, 39, 50} Se observó, en la síntesis de nanopartículas de plata, que durante los primeros pasos del proceso se formaban clústeres de pocos átomos que serían los precursores de las nanopartículas. El mecanismo propuesto es contrario a las teorías previas existentes sobre formación de nanopartículas consistentes en la nucleación y crecimiento de núcleos en disolución, que proponen un control termodinámico de la reacción en que las partículas por debajo de un tamaño crítico son energéticamente inestables debido a su alta energía de Laplace. No obstante, esta teoría no tiene en cuenta la existencia de clústeres de pequeño tamaño que pueden ser estables debido a su estructura electrónica y geométrica.

Rodríguez-Sánchez *et al.* encontraron evidencias de la presencia de clústeres de Ag_n ($n \leq 10$) durante todo el proceso de síntesis. Tales clústeres actuarían como precursores de las nanopartículas más grandes.³⁸ Estudiando el mecanismo y la cinética de formación de nanopartículas de plata

electroquímicamente encontraron el clúster Ag_4^{2+} como el precursor mayoritario de la formación de partículas, además de comprobar que los clústeres de un tamaño distinto resultaban más inestables, siendo su formación más difícil con la presencia de oxígeno en el medio.³⁹ Estos resultados preliminares abrieron la puerta a un posible control cinético de la reacción para la obtención de clústeres de pequeño tamaño.

El método electroquímico se basa, como ya se ha mencionado, en la reducción de cationes del metal, oro en nuestro caso, procedentes de la disolución anódica de un electrodo de este metal, sobre la superficie del contraelectrodo que funciona como cátodo. Todo ello en presencia de una especie estabilizadora que además sirve de electrolito soporte. Para la optimización del método es necesario controlar los parámetros de síntesis como son: el disolvente empleado, el electrolito soporte, el contraelectrodo, la densidad de corriente aplicada y el tiempo total de síntesis.

En nuestro caso, se decidió usar como electrolito soporte sales de tetraalquilamonio y como disolvente acetonitrilo, ya que habían sido usados previamente en nuestro laboratorio en la síntesis de nanopartículas y clústeres con buenos resultados.

La elección del contraelectrodo es importante ya que además de conducir la corriente, sus características pueden determinar el que la síntesis tenga o no lugar. Normalmente durante el proceso de síntesis electroquímica de nanopartículas tienen lugar dos procesos competitivos: el crecimiento de las partículas y la deposición de cationes del metal en la superficie del cátodo. Este último proceso disminuye el rendimiento de la reacción, ya que, una vez que la superficie metálica se encuentra totalmente cubierta, la formación de nanopartículas se para y el único proceso que tiene lugar es la deposición de nuevos átomos de oro sobre la película ya existente en el cátodo. Así, resulta que cuanto más se dificulte el proceso de deposición más eficaz será la síntesis.

En la tabla 1 aparecen detalladas las características cristalográficas y el radio atómico de los distintos metales de los electrodos disponibles en nuestro laboratorio. Cuanto mayor sea la semejanza estructural entre el oro y el metal empleado como cátodo mayor será la tendencia a depositarse sobre él, así a la vista de los parámetros de red y los radios atómicos, los metales más

adecuados en nuestro caso serían el cobre y el platino. En este trabajo se decidió trabajar con una lámina de platino como contraelectrodo.

Tabla 1. Características estructurales del oro y los distintos materiales catódicos disponibles.

Metal	Estructura cristalográfica	Parámetro de red¹⁴⁰ /nm	Radio atómico¹³⁴ /pm
Au	fcc	0.40782	144
Ag	fcc	0.40857	144
Al	fcc	0.40496	143
Cu	fcc	0.36146	128
Pt	fcc	0.39236	139

Es importante también la elección de la densidad de corriente aplicada durante el proceso ya que esta determina el tamaño de los agregados obtenidos. En general el tamaño disminuye al aumentar la densidad de corriente. Por otra parte, corrientes pequeñas favorecen la electrodeposición de los cationes metálicos. En la síntesis de nanopartículas de plata entre 1-6 nm los valores óptimos se encuentran entre $1\text{-}7\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$.³⁹

Es necesario alcanzar un valor de compromiso que permita la estabilización de los clústeres sin que se lleguen a formar nanopartículas, en nuestro caso emplearemos dos valores distintos de corriente: un valor intermedio ($5\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) y una densidad de corriente mayor de ($10\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$).

El parámetro crítico para la obtención de clústeres mediante este método es el tiempo de síntesis, ya que hay que evitar llegar a la formación de nanopartículas y esto suele ocurrir a tiempos relativamente cortos. La síntesis de nanopartículas suele tener una duración aproximada de 4000-5000 s. En las etapas iniciales el potencial aumenta rápidamente (i.e., un aumento en valor absoluto ya que se vuelve más negativo) debido a que la corriente impuesta al sistema exige la reducción de una considerable concentración de cationes metálicos. Cuando esta se alcanza (aproximadamente a los 500 s de síntesis) el potencial permanece constante mientras se van formando

complejos metálicos con la sal de tetraalquilamonio, clústeres precursores y finalmente las nanopartículas. Se produce una disminución del potencial al alcanzarse el potencial de deposición y la producción de nanopartículas finalmente se para.

1.1 Procedimiento general de síntesis

Para llevar a cabo los distintos experimentos se usó un potenciostato Autolab PGSTAT 20, la temperatura se mantuvo termostatzada $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y todos los potenciales se midieron contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Las electrólisis se llevaron a cabo en una celda electrolítica, donde se situaron los dos electrodos enfrentados. En todos los experimentos el cátodo consistió en una lámina de platino con una superficie de 2.5 cm^2 actuando como electrodo de trabajo y como ánodo se empleó una lámina de oro de la misma superficie actuando como contraelectrodo. La superficie del contraelectrodo de oro se activó en la primera síntesis mecánicamente mediante un pulido con óxido de aluminio y químicamente con ácido nítrico. El electrodo de platino se limpió mediante un pulido a mano con óxido de aluminio y después se sometió a barridos de potencial mediante voltamperometría cíclica (entre 1.35 y -0.15 V) con una velocidad de 0.5 V/s, en una disolución acuosa de ácido sulfúrico 1M.

Tabla 2. Condiciones generales de síntesis electroquímica de clústeres de oro. **TBABr** bromuro de tetrabutilamonio, **TOABr** bromuro de tetraoctilamonio. **j**: densidad de corriente.

Experimento	$j/\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$	Electrolito	Tiempo/s
AuCLsE1	5	TBABr	570
AuCLsE2	10	TBABr	628
AuCLsE3	10	TOABr	715
AuCLsE4	10	TBABr	945
AuCLsE5	10	TBABr	945

En todos los casos el electrolito soporte fue una disolución de una sal de tetraalquilamonio, 0.1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada

burbujeando nitrógeno durante al menos 15 minutos. Durante todo el proceso de electrólisis se mantuvo una fuerte agitación y atmósfera de nitrógeno, para homogeneizar el medio y favorecer la formación de clústeres. Se realizaron cinco experimentos en los que se varió la densidad de corriente aplicada y el electrolito soporte (tabla 2).

La variación del potencial de los electrodos en todas las síntesis fue similar, figura 4, aunque se encuentran ciertas diferencias, sobre todo en el caso de la síntesis AuCLsE4. Esto último llama especialmente la atención ya que las condiciones de esta síntesis fueron equivalentes a la síntesis AuCLsE5.

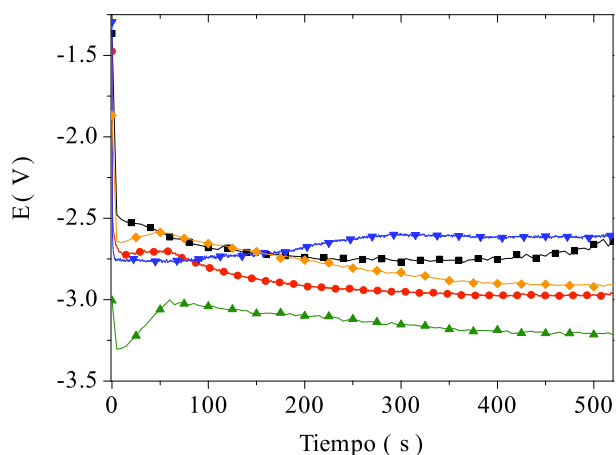


Figura 4. Evolución del potencial del electrodo durante las síntesis AuCLsE1 (■), AuCLsE2 (●), AuCLsE3 (▲), AuCLsE4 (▼) y AuCLsE5 (◆).

Para entender las diferencias entre el potencial del electrodo en la síntesis de los clústeres es necesario evaluar su comportamiento en todos los tramos diferenciados en la gráfica.^{51, 52}

Inicialmente se produce un fuerte aumento del valor de potencial catódico, seguido de una apreciable estabilización entre los 40 y 100 s, manteniéndose relativamente constante en el tiempo hasta el final de la síntesis, en que se observa una progresiva disminución del potencial.

El comportamiento general de las curvas responde a las etapas características de la técnica empleada, la cronopotenciometría galvanostática. En un experimento cronopotenciométrico existe siempre un cambio inicial brusco

del potencial que representa la ruptura del equilibrio del sistema en estado estacionario.

Los subsiguientes cambios son debidos a dos procesos, el primero es la carga de la doble capa, que domina a tiempos mas cortos y que provoca un desplazamiento del potencial catódico hacia valores menos negativos. El segundo proceso es debido al paso de electrones a través de la doble capa hacia el electrodo, reduciendo los iones producidos en el ánodo por medio de un desplazamiento del potencial hacia valores mas negativos. Este último efecto domina a tiempos más largos, hasta alcanzar un valor estacionario cuando el efecto de la doble capa se hace despreciable.

La variación del potencial observado en la figura 4 responde a la suma de estos dos efectos. Es de notar que, debido al gran tamaño de los electrodos empleados, la contribución de la doble capa será importante, y así mismo será importante el efecto del sobrepotencial de reducción. En nuestro caso la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo no solo deberá ser capaz de provocar la transferencia de carga a través de la interfase de trabajo, sino que ha de generar los propios iones metálicos en el ánodo soluble (éstos no existen previamente en la disolución). La suma de ambas contribuciones puede explicar la “meseta” observada en los primeros instantes de la síntesis antes de llegar a alcanzar el estado estacionario de potencial constante. Esto se observa, en efecto, para las cinco síntesis que se llevaron a cabo, tras el aumento inicial del potencial se observa una primera meseta (más larga al aumentar la magnitud de la corriente que le pedimos al sistema) durante el primer minuto, correspondiente a la “cancelación” de los dos efectos anteriormente mencionados.

No obstante, en el experimento AuCLsE4, se puede observar el desplazamiento del potencial hacia valores menos negativos y así mismo una estabilización del potencial a tiempos más largos (aproximadamente 250 s) que en las otras síntesis. Este comportamiento del potencial parece responder a un predominio del efecto de la doble capa (disminución del sobrepotencial) hasta tiempos mas largos, antes de alcanzar el estado estacionario.

Para interpretar este diferente comportamiento debemos observar el estado del electrodo de trabajo empleado. La figura 5 corresponde a las curvas

voltamperométricas, en ácido sulfúrico, del electrodo de platino empleado en la síntesis AuCLsE4 y la AuCLsE5 añadida a efectos comparativos.

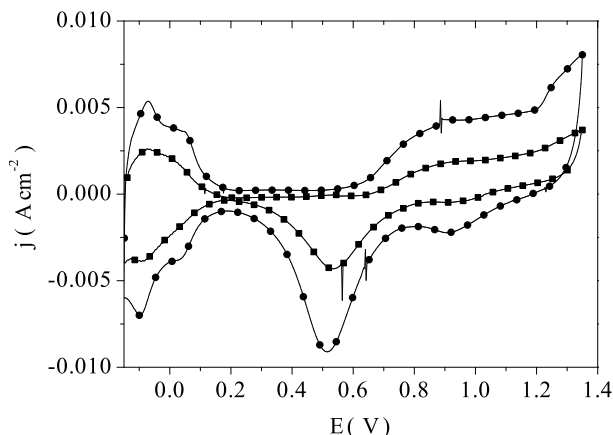


Figura 5. Limpieza del electrodo de Pt en las síntesis AuCLsE4 (■) y AuCLsE5 (●).

Cuando se lleva a cabo la limpieza del electrodo típicamente se observa la formación del óxido y posterior reducción del metal, en el intervalo de potenciales entre +0.3V y +1.2V, así como los picos de adsorción del hidrógeno en la zona de potenciales más bajos. Puede observarse que el platino utilizado el experimento AuCLsE4 muestra una menor definición de los picos de adsorción de hidrógeno. De hecho la curva voltamperométrica cíclica del platino empleado en esta síntesis muestra un perfil típico de contaminación con otro metal (pequeño pico a +0.5V), lo que indica que probablemente algunos clústeres de oro producidos anteriormente no pudieron ser eliminados totalmente mediante la limpieza mecánica/electroquímica llevada a cabo.

Existen precedentes en la bibliografía de compuestos intermetálicos del platino que presentan curvas voltamperométricas similares a esta. Estos resultados indican que la reconstrucción de la superficie del electrodo durante los sucesivos barridos cíclicos no fue óptima, conduciendo probablemente a un electrodo más difícilmente polarizable que en los demás casos, lo que conduciría a una ralentización en la construcción de la doble capa, con predominio del efecto de aumento del potencial hasta tiempos mas largos.

Volviendo a la figura 4, hay que tener en cuenta que, en general, en este tipo de técnicas, alcanzar el régimen estacionario lleva un tiempo considerable debido a la estabilización de la concentración de las especies intermedias de las reacciones complejas. En nuestro caso se requiere el establecimiento de un equilibrio entre la velocidad de formación de los primeros clústeres y la generación de nuevos cationes de oro. Finalmente, el desplazamiento del potencial hacia valores menos negativos que se observa al final de todas las síntesis puede ser interpretado teniendo en cuenta el efecto de una lenta deposición de átomos de oro sobre el electrodo de platino, la cual ha sido posteriormente observada sobre el electrodo una vez fuera de la cubeta electrolítica.

En el caso de la curva en la síntesis AuCLsE5, el mayor potencial alcanzado se explica teniendo en cuenta el diferente electrolito soporte utilizado como se explicará detalladamente más adelante.

Se realizó en todas las muestras, excepto para la muestra AuCLsE1, un tratamiento con dodecanotiol para estudiar el comportamiento de los clústeres y así mismo evaluar su posible protección. Para la síntesis AuCLsE2 se realizó la adición de dodecanotiol a distintos tiempos (siempre añadiendo aproximadamente el mismo volumen de una disolución 2 M de dodecanotiol en pentano y dejando agitar durante dos horas). En la síntesis AuCLsE3 la adición del dodecanotiol se llevó a cabo justo tras la síntesis, en la síntesis AuCLsE4 tras 21 días y en la síntesis AuCLsE5 tras diez días de preparación.

1.2 Estudio de las variables de síntesis

El material obtenido en todas las síntesis se estudió mediante espectroscopía UV-vis. Como ya se ha mencionado en la introducción, los clústeres atómicos de pequeño tamaño, al contrario que las nanopartículas mayores de 1.5 nm, no presentan banda plasmónica y su espectro consiste en bandas discretas tipo molecular. Así que se realizó el seguimiento de la reacción y los clústeres formados mediante la aproximación del modelo del Jellium que, tal como se explicó de forma detallada en la introducción, proporciona una relación entre el tamaño del clúster y su banda de absorción en el espectro,^{18, 27, 29} usando la ecuación 3, donde N es el número de átomos del clúster, E_F la energía de Fermi del metal (5.35 eV en el caso del oro) y E la energía del “band-gap”,

que se asume como igual a la emisión en fluorescencia, habría que sumar 0.5 eV para tener en cuenta el desplazamiento de Stokes:

$$E = E_f / N^{1/3} + 0.5 \quad (3)$$

A la hora de llevar a cabo la asignación del número de átomos por clúster, correspondientes a cada máximo en el espectro de absorción UV-vis, el procedimiento fue el mismo en todos los casos. En primer lugar se hizo un ajuste lorentziano del espectro con el número de picos necesario para obtener el mejor ajuste. A continuación se calcula el número de átomos por clúster mediante la ecuación 3 para cada uno de los máximos de absorción.

Un ejemplo de este procedimiento en el espectro de absorción de la muestra AuCLsE4 se puede ver en la figura 6. El espectro se ajustó a tres picos con máximos a 256, 275 y 343 nm.

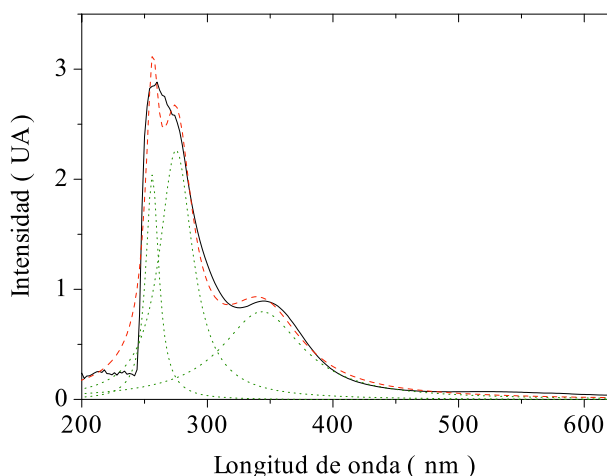


Figura 6. Ejemplo del ajuste Lorentziano del espectro de absorción UV-vis de la muestra AuCLsE4: datos experimentales (—), picos obtenidos (···), espectro suma de los picos obtenidos (---).

Para el primer máximo se calcularía un clúster de dos átomos, como se puede ver sustituyendo en la ecuación:

$$E = E_f / N^{1/3} \rightarrow N = (E_f / E)^3$$

$$E = 256 \text{ nm} \rightarrow E = 4.85 \text{ eV}$$

$$E - 0.5 = 4.35 \text{ eV}$$

$$N = (5.35 / 4.35)^3 = 1.86 \approx 2$$

Repitiendo este procedimiento para los otros dos picos se llega a $N \approx 3$ y $N \approx 6$.

El espectro de absorción de cada muestra tras el proceso electroquímico se puede ver en la figura 7, como se deduce de la presencia de bandas discretas en los espectros y la ausencia de la banda plasmónica característica del oro, las muestras están compuestas de clústeres de oro de pequeño tamaño.

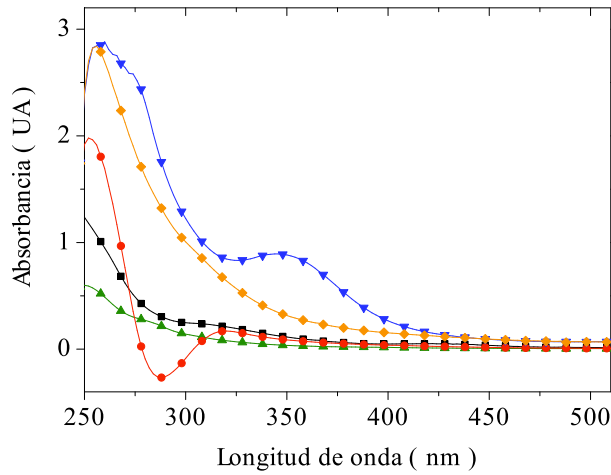


Figura 7. Espectros de absorción UV-vis tras finalizar las síntesis electroquímicas AuCLsE1 (■), AuCLsE2 (●), AuCLsE3 (▲), AuCLsE4 (▼), AuCLsE5 (◆).

En la tabla 3 se encuentran detallados los máximos de absorción obtenidos al final de cada síntesis, así como la asignación de estos máximos a los tamaños correspondientes, según el procedimiento descrito. Aunque el resultado es variable, se han obtenido clústeres de pequeño tamaño, siendo el menor de dos átomos de oro y el mayor de doce.

Tabla 3. Clústeres obtenidos en cada síntesis tras finalizar el proceso electroquímico.

Experimento	Máx. Absorción/nm	Clústeres
AuCLsE1	249-260, 299, 425	Au ₂ , Au ₃ , Au ₁₂
AuCLsE2	256, 288, 325	Au ₂ , Au ₃ , Au ₅
AuCLsE3	249-260, 300	Au ₂ , Au ₄
AuCLsE4	256, 275, 343	Au ₂ , Au ₃ , Au ₆
AuCLsE5	254-266, 293	Au ₂ , Au ₃

En el experimento AuCLsE1 se realizó un espectro UV-vis a dos tiempos durante la síntesis para comprobar la evolución de la formación de clústeres, figura 8.

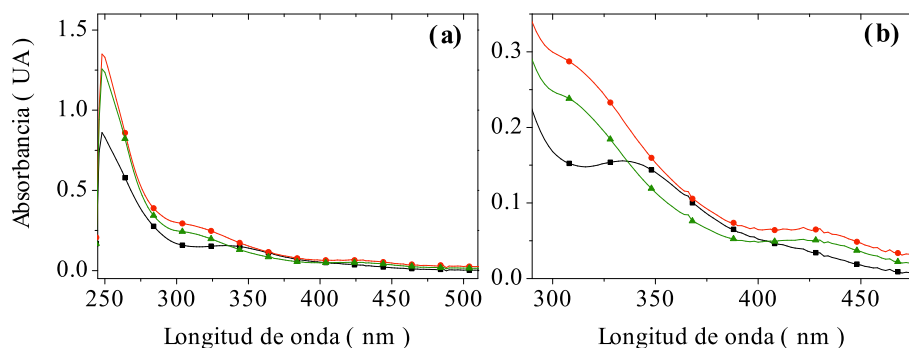


Figura 8. Espectro de absorción UV-vis de la síntesis AuCLsE1 a los 225 s (■), 550 s (●) y al final de la síntesis (▲). (a) Espectro completo y (b) detalle de las bandas a mayores longitudes de onda.

La intensidad de absorción aumenta durante el transcurso de la reacción, desde los momentos iniciales hasta los 550 s, en que se mantiene aproximadamente constante hasta la última medida al final de la síntesis. Mediante el ajuste lorentziano de los espectros se calcularon los picos en cada caso, de esta forma se pudo comprobar que a los 225 s el espectro presenta una absorción intensa a 249 nm y dos bandas más pequeñas a 262 y 325 nm. Cuando la reacción se aproxima al final las bandas a 249 y 262 nm aumentan

de intensidad, y la banda a 325 nm desaparece para dar lugar a dos nuevas absorciones a 300 y 427 nm.

Posteriormente se asociaron estos máximos de absorción a clústeres concretos mediante el procedimiento descrito anteriormente, así que inicialmente se forman clústeres de dos y cinco átomos de oro, el clúster Au_2 aumenta su concentración, mientras que el clúster de Au_5 desaparece para dar lugar a clústeres de Au_3 y Au_{12} .

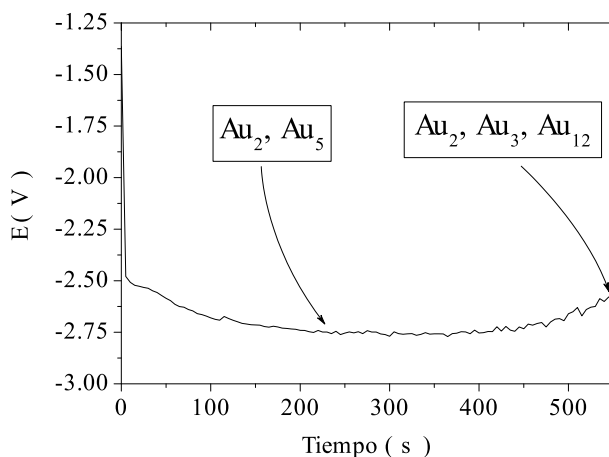


Figura 9. Evolución del potencial durante la síntesis AuCLsE1, indicando los clústeres presentes a 225 y 550 s.

Los tiempos a los que se midieron los espectros de absorción se corresponden con un punto en que el potencial se ha estabilizado (225 s) y un tiempo próximo al final, en que el potencial vuelve a aumentar de forma suave (550 s), figura 9. Esto parece indicar que por encima de los 400 s de síntesis el aumento en el potencial genera clústeres de mayor tamaño y mayor dispersión de tamaños en la muestra final. La formación de los clústeres mas grandes al final de la síntesis, cuando el potencial se hace menos negativo, podría responder a procesos de coalescencia y/o de reducción de algunos iones por el hidrógeno desprendido sobre el platino a altos sobrepotenciales, debido a que la transferencia de carga en la interfase conduce a una cierta electrodeposición de oro, que cada vez será mas favorable. Dicha electrodeposición parece inhibirse para condiciones más extremas, es decir, para corrientes altas, permitiendo emplear tiempos de síntesis mas largos.

Por otra parte, se estudió el efecto del tiempo en condiciones estacionarias. Como se veía en la tabla 2, las síntesis AuCLsE2 y AuCLsE5 se llevaron a cabo en las mismas condiciones pero con distintos tiempos de síntesis. En la figura 10 se puede ver en detalle las diferencias entre los espectros de absorción y la evolución del potencial en estos casos. A mayor tiempo de síntesis la concentración global de clústeres aumenta, permaneciendo constante el tipo de clústeres que se obtienen (haciendo el ajuste lorentziano de los espectros y mediante la aproximación del Jellium son Au_2 y Au_4).

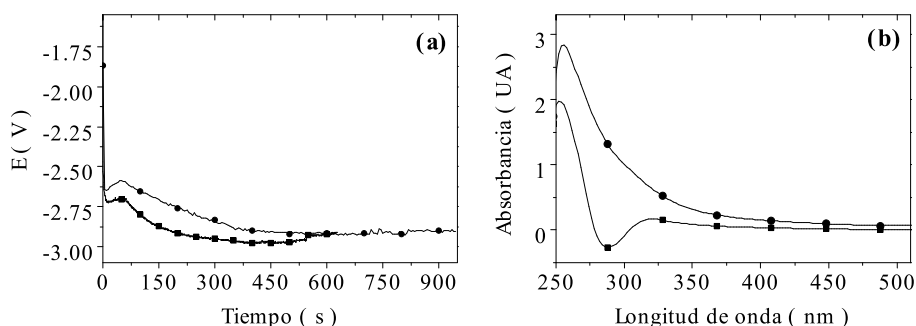


Figura 10. (a) Evolución del potencial y (b) espectro UV-vis de las síntesis AuCLsE2 (■) y AuCLsE5 (●) en que el tiempo total de síntesis fue de 628 y 945 s, respectivamente.

En ambos casos el potencial alcanzó un valor constante. En este estado estacionario, la corriente aplicada provoca un aumento en la concentración de los clústeres más estables, es decir, de dos y cuatro átomos, cuando aumenta el tiempo de síntesis, sin que se genere ningún clúster nuevo.

Otro de los factores estudiados fue el electrolito soporte utilizado durante la síntesis. Para ello, se probaron dos sales de tetraalquilamonio con cadenas de distinta longitud como son los bromuros de tetrabutilamonio (TBA) y tetraoctilamonio (TOA), la única diferencia entre ambas sales radica en el tamaño del catión amonio de la sal, con cadenas de cuatro carbonos en el caso del TBA y ocho carbonos en el TOA. El efecto de la sal se estudió comparando las síntesis AuCLsE2 y AuCLsE3 en que se usaron TBABr y TOABr respectivamente, los resultados se muestran en la figura 11.

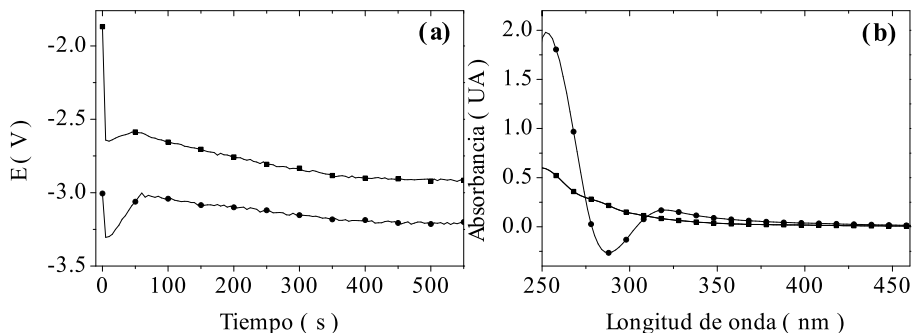


Figura 11. (a) Evolución del potencial y (b) espectro UV-vis de las síntesis AuCLsE2 (■) y AuCLsE3 (●) con TBABr y TOABr como electrolito soporte, respectivamente.

El espectro de absorción UV-vis muestra la presencia de clústeres de dos y cuatro átomos de oro en el caso del TBA y de dos, tres y cinco átomos para el caso del TOA. Con respecto al potencial se puede ver cómo en la síntesis en que se usó la sal de TOA los potenciales alcanzados fueron menores, lo que produce la formación de clústeres más grandes y con una mayor dispersión de tamaños. En ambos casos el clúster más pequeño obtenido es Au_2 .

La sal de TOA es mucho más voluminosa que la de TBA y por lo tanto más deformable. La influencia que ejerce la longitud de la cadena del catión en sales de tetralquilamonio sobre el potencial del electrodo ha sido estudiada anteriormente por Roth *et al.* y explicada en términos de las modificaciones que sufre la doble capa debido a la adsorción del ión.⁵³ Así, según estos autores, al aumentar la longitud de la cadena se modifica el perfil de la variación del potencial con la distancia a través de la doble capa interna, ya que al aumentar el radio del catión el plano exterior de Helmholtz (OHP) se situará cada vez más lejos de la superficie del metal. Suponiendo un modelo sencillo de variación lineal del potencial, esto hace que tengan que alcanzarse mayores sobrepotenciales para provocar la transferencia de carga a la distancia de adsorción de los iones metálicos. Este aumento del sobrepotencial en este sentido es el que se observa en la figura 11 (a).

Por otro lado, como la densidad de corriente (o lo que es lo mismo, la velocidad de la reacción) se mantiene constante, podría pensarse también en un mayor impedimento estérico en el caso del TOA que impide la adición de nuevos átomos de oro.

1.3 Estabilidad y tratamiento post-síntesis

Tras el estudio de los distintos parámetros que afectan a la síntesis se investigó la estabilidad de los clústeres con el tiempo una vez sintetizados.

En el caso de la síntesis AuCLsE1 se midió el espectro de absorción durante los seis días posteriores (figura 12). Aunque las bandas siguen siendo las mismas, sus intensidades varían y por tanto la concentración de los clústeres presentes en la muestra también varía. Los máximos de absorción debidos a los clústeres de Au_2 y Au_3 disminuyen su intensidad, mientras que el máximo correspondiente al clúster de Au_{12} se mantiene más o menos constante.

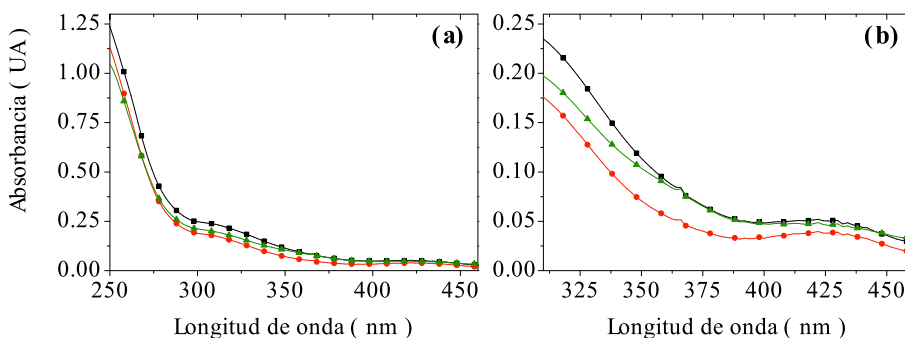


Figura 12. Evolución del espectro de absorción UV-vis del experimento AuCLsE1 tras la síntesis: inicialmente (■), después de 3 días (●) y después de 6 días (▲). (a) Espectro completo y (b) detalle de las bandas a mayores longitudes de onda.

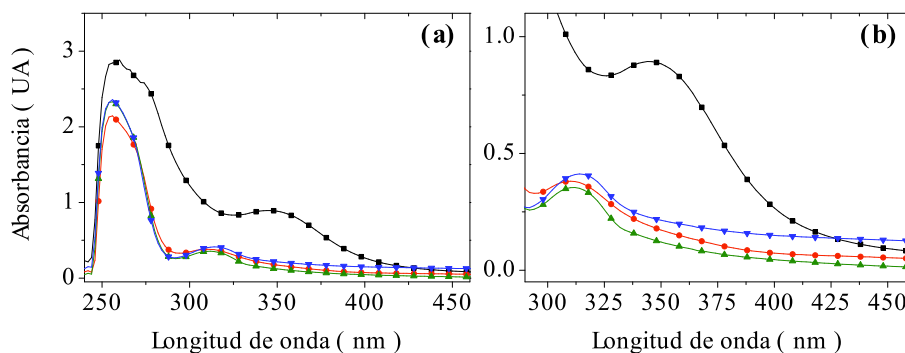


Figura 13. Evolución del espectro de absorción UV-vis del experimento AuCLsE4 tras la síntesis: inicialmente (■), después de 1 día (●), después de 2 días (▲) y después de 21 días (▼). (a) Espectro completo y (b) detalle de las bandas a mayores longitudes de onda.

En la síntesis AuCLsE4 se realizó el mismo estudio, sólo que en este caso las medidas del espectro se prolongaron durante 21 días después de la síntesis (figura 13).

En este caso el cambio en el espectro tras el primer día es muy pronunciado, disminuyendo notablemente la concentración de los clústeres. La banda a 254 nm (Au_2) se mantiene constante, sin embargo el hombro a 275 nm correspondiente al clúster de tres átomos de oro desaparece con el tiempo. En la ampliación del espectro se puede ver que la banda a 350 nm (Au_6) disminuye mucho su intensidad, hasta convertirse en un hombro de una nueva banda a 316 nm que corresponde a la formación de un nuevo clúster de Au_4 .

Con estos estudios se ha comprobado que los clústeres obtenidos mediante estas síntesis no son estables frente al envejecimiento. Una posible explicación podría ser el crecimiento de los clústeres a expensas de la desaparición de otros o de iones de oro sin reducir que haya en la muestra. No obstante Au_2 y Au_4 siguen siendo las especies más estables.

Debido a la inestabilidad se planteó el uso de algún agente protector. Cuando se trabaja con nanopartículas de oro lo más común es recurrir al desplazamiento de las sales de tretraalquilamonio por otra molécula que tenga una mayor afinidad con el oro y que proteja la partícula de una forma más eficaz, como suelen ser fosfinas y sobre todo tioles. En este caso se usó dodecanotiol,^{54, 55} un tiol de cadena larga soluble en disolventes orgánicos apolares, como el pentano e insoluble en acetonitrilo, el disolvente usado en la síntesis, para además poder facilitar la purificación de los clústeres obtenidos.

En la síntesis AuCLsE2 se estudiaron las variaciones del espectro de la muestra al añadir, a distintos tiempos tras la síntesis, una disolución 2M de dodecanotiol en pentano, disolvente inmiscible con el acetonitrilo. En la figura 14 se muestran los espectros de absorción UV-vis de la fase de pentano con dodecanotiol. La poca resolución que muestran estos espectros probablemente es debida a la presencia de un exceso de dodecanotiol. Debido a la alta solubilidad del tiol en pentano, se puede ver que su intensidad disminuye hasta hacerse inexistente al hacer la extracción en días sucesivos, así que puede concluirse que, con el paso del tiempo, se hace más difícil la unión del tiol a los clústeres presentes en la disolución.

En la muestra AuCLsE4 la protección se llevó a cabo 21 días después de la síntesis. En este caso se observaron los cambios en la fase de acetonitrilo (figura 15). Los espectros de absorción apenas varían a 250 nm de longitud de onda (aproximadamente), mientras que se observa una disminución de la banda asociada al clúster de seis átomos de oro (343 nm). Por lo que sólo parecen extraerse los clústeres de mayor tamaño, de acuerdo con lo observado también en la figura 14.

Por otra parte, en las síntesis AuCLsE3 y AuCLsE5 se hizo el mismo procedimiento y se observó la precipitación progresiva de unos sólidos en la fase de pentano protegida con dodecanotiol, de color amarillo en el caso de la primera y rojo en el caso de la segunda. Al separar el sólido por ultracentrifugación siguió precipitando más sólido hasta que la disolución quedó totalmente transparente e incolora.

El experimento AuCLsE3 antes de la protección contenía clústeres de Au_2 y Au_4 , según el espectro de absorción UV-vis (tabla 3). Sin embargo, en el sólido amarillo aunque estos clústeres se mantienen se observan también dos nuevos clústeres de Au_6 y Au_9 (figura 16).

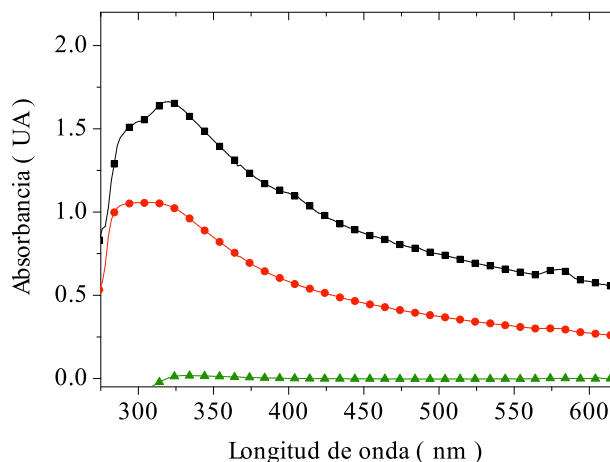


Figura 14. Espectros de absorción UV-vis de la muestra AuCLsE2 tras la extracción en pentano: el mismo día de la síntesis (■), un día más tarde (●) y cuatro días más tarde (▲).

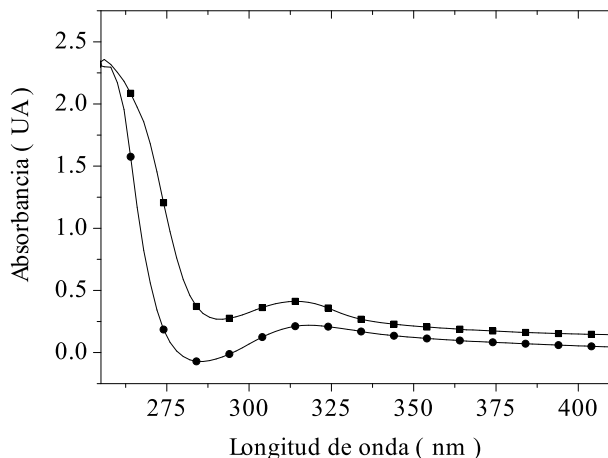


Figura 15. Espectro de absorción UV-vis de la muestra AuCLsE4 antes (■) y después (●) de la extracción con dodecanotiol.

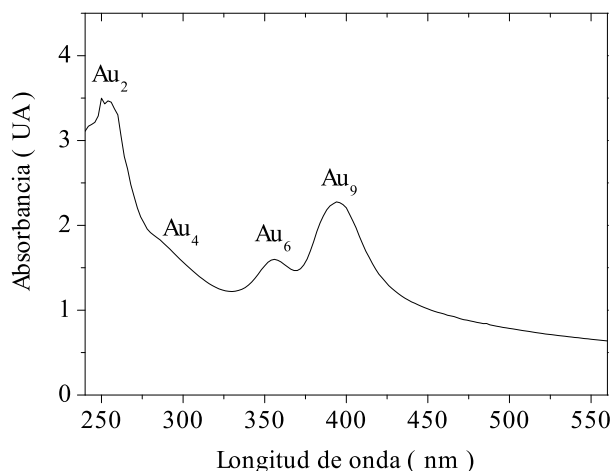


Figura 16. Espectro de absorción UV-vis del sólido amarillo precipitado en la síntesis AuCLsE3. Sobre la gráfica señalados clústeres correspondientes a cada máximo.

Además se comprobó que el experimento AuCLsE5, justo tras la síntesis contenía clústeres Au_2 y Au_3 , y tras extraerlos con dodecanotiol en pentano, el tamaño de los clústeres aumentó, figura 17. Sólo se mantiene el clúster de tres átomos de oro, que sigue en disolución tras la precipitación del sólido rojo. Además de aparecer clústeres de cuatro y diez átomos de oro, destaca la presencia del clúster Au_{20} en una concentración comparable a la del clúster más pequeño. Esta nueva banda también podría deberse a la formación de

nanopartículas de oro de mayor tamaño, ya que se encuentra en la zona típica de la banda plasmónica del oro (en torno a 500-600 nm).⁵⁶

El sólido rojo precipitado de esta muestra se disolvió fácilmente en pentano, además de en otros disolventes orgánicos tras llevarlo a sequedad concentrando a vacío. El espectro de absorción UV-vis de los clústeres en pentano, dodecano, diclorometano y cloroformo aparece representado en la figura 18.

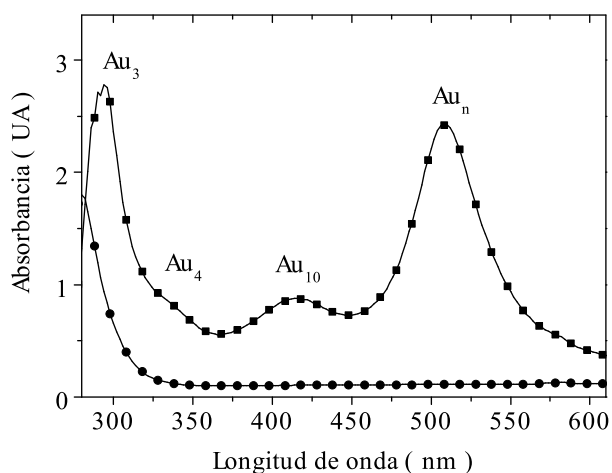


Figura 17. Espectros de absorción UV-vis de la síntesis AuCLsE5 tras la protección con dodecanotiol: antes (■) y después (●) de la precipitación del sólido rojo.

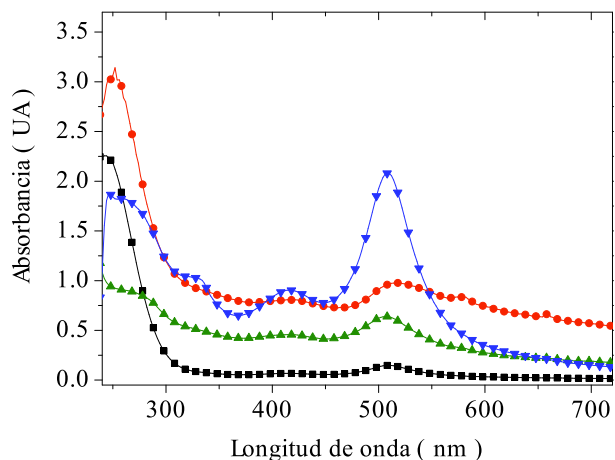
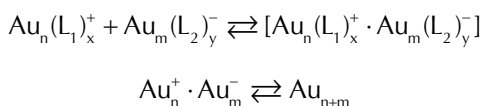


Figura 18. Espectro de absorción UV-vis del sólido rojo (AuCLsE5) en distintos disolventes: pentano (■), dodecano (●), CH₂Cl₂ (▲) y CHCl₃ (▼).

Este efecto ha sido observado previamente para clústeres de plata y oro sintetizados también mediante un método electroquímico en nuestro grupo de investigación.⁵⁷ En este trabajo se explica la variabilidad de los espectros de absorción en agua, hexano y diclorometano en base a varios factores, entre los que se encuentra la mayor polarizabilidad de los clústeres más grandes y varios procesos de agregación reversible e irreversible que pueden tener lugar.

Por una parte, hay que tener en cuenta que tras la reacción se encontrarán en disolución una mezcla de clústeres pequeños de varios tamaños, tanto neutros como cargados positiva y negativamente, así como de cationes metálicos sin reducir.³⁸ Debido a la presencia de clústeres de carga opuesta pueden existir equilibrios de formación de compuestos iónicos, dando lugar a la formación de clústeres de mayor tamaño (esquema 1). El desplazamiento del equilibrio a un lado o a otro se verá favorecido según la polaridad del disolvente.

Esquema 1. Equilibrio de clústeres de distinto tamaño en disolución.



También se ha observado cómo en algunos disolventes polares apróticos, como el diclorometano, estos compuestos iónicos formados por clústeres de carga opuesta, se agregan irreversiblemente, dando lugar a clústeres de mayor tamaño e incluso nanopartículas.

En nuestro caso resulta difícil evaluar la tendencia que siguen los clústeres en los distintos disolventes, tabla 4, ya que en algunos casos la diferencia entre ellos no parece suficiente como para justificar la variabilidad. Esto ocurre en el caso del pentano y el dodecano, ambos disolventes apolares que tan sólo difieren en el tamaño de longitud de la cadena. Si parece coherente el hecho de que el disolvente más polar, como es el cloroformo lleve a la formación de clústeres de mayor tamaño. Sería necesario realizar más pruebas para poder establecer una tendencia como la observada en la bibliografía, sobre todo con disolventes de características más diferentes.

Tabla 4. Máximos de absorción del sólido rojo obtenido en la síntesis AuCLsE5 en distintos disolventes.

Disolvente	Longitud de onda/nm				
	Au ₂	Au ₅	Au ₁₀	Au ₁₁	Au _{n>20}
Pentano	248	—	—	—	515
Dodecano	262	333	409	—	537
CH ₂ Cl ₂	268	—	404	—	510
CHCl ₃	248/268	331	—	412	510

1.4 Caracterización de los sólidos obtenidos

Los dos sólidos obtenidos en los experimentos AuCLsE3 y AuCLsE5 se caracterizaron mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM - transmission electron microscopy-).

En el caso del sólido amarillo obtenido en la síntesis AuCLSE3 las imágenes obtenidas no fueron muy buenas debido a la presencia de acumulaciones de materia orgánica en la superficie de la rejilla (probablemente el dodecanotiol usado para la extracción de los clústeres); sin embargo para el sólido rojo obtenido en la síntesis AuCLsE5, se comprobó la presencia de nanopartículas de gran tamaño (figura 19).

Aunque en un principio esto contrasta con la presencia de clústeres mucho más pequeños corroborada mediante espectroscopía de absorción UV-vis, este es un efecto que ya ha sido observado anteriormente en la bibliografía.^{36, 58} Ledo *et al.* mostraron para clústeres de plata (sintetizados en microemulsión) mediante microscopía de efecto túnel (STM -scanning tunneling microscopy-), como las partículas aparentemente en 3D observadas en TEM consistían realmente en nanoislas en 2D formadas por los clústeres dispuestos sobre la superficie de la rejilla con una altura de tan sólo un átomo.

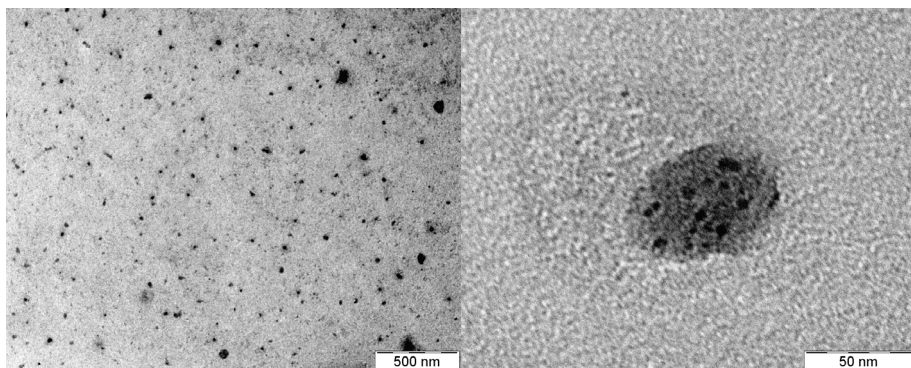


Figura 19. Imágenes de TEM del sólido obtenido en la síntesis AuCLsE5 a distintos aumentos.

Además, en ambas muestras, a la hora de tratar de alcanzar los mayores aumentos se observó como la lente del microscopio se desenfocaba, esto sugirió la presencia de magnetismo en los clústeres por lo que se decidió estudiar el comportamiento magnético de la muestra. Para aclarar este aspecto se hicieron medidas de resonancia paramagnética electrónica (EPR-electron paramagnetic resonance-) de los sólidos.

Para el experimento AuCLsE3 el espectro de EPR muestra un pico demasiado pequeño para ser considerado (figura 20). Sin embargo, en el caso de la muestra AuCLsE5 se observa una señal muy clara en el espectro de EPR centrada a 1000 G, con una estructura hiperfina de difícil interpretación (figura 21).

Se puede calcular el valor del factor g mediante la ecuación 4,⁵⁹ donde \hbar es la constante de Planck ($6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$), ν es la frecuencia del campo aplicado en la medida ($9.424 \text{ GHz} = 9.424 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$), μ_B es el magnetón de Bohr ($9.274 \times 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$) y H es el valor del campo en el punto medio de la señal en el espectro ($962 \text{ G} = 0.0962 \text{ T}$). Sustituyendo estos valores en la ecuación se obtiene un valor del factor g de 7.0 unidades.

$$g = \hbar \nu / \mu_B H \quad (4)$$

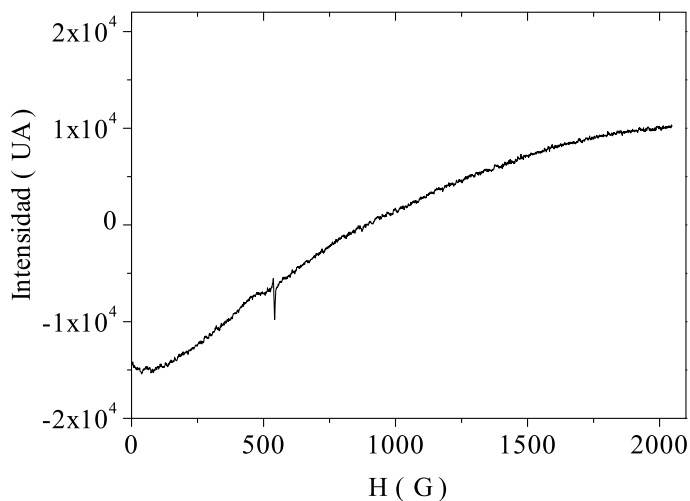


Figura 20. Espectro de EPR del sólido amarillo obtenido en la síntesis AuCLsE3, realizado a 120 K y 9.424 GHz.

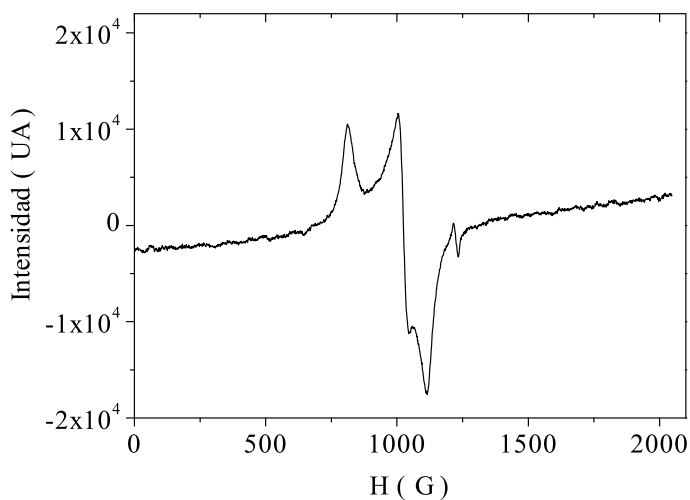


Figura 21. Espectro de EPR del sólido rojo obtenido en la síntesis AuCLsE5, realizado a 120 K y 9.424 GHz.

El valor de g para el electrón libre, correspondiente a un comportamiento puramente paramagnético, es de 2. El hecho de que en esta muestra se haya encontrado un valor mayor indica la existencia de un campo coercitivo, típico de los materiales ferromagnéticos. Nosotros postulamos que se trata de la

agrupación de clústeres en forma de agregados (como los observados mediante TEM) los responsables de este comportamiento magnético fuerte.

Este comportamiento magnético del oro contrasta con sus propiedades clásicas. Crespo *et al.* encontraron en 2004 ferromagnetismo asociado a nanopartículas de oro recubiertas con tioles y explicaron este comportamiento en base a la interacción del grupo tiol del agente protector con los átomos de oro de la superficie de la nanopartícula.⁶⁰ En nuestro grupo de investigación, sin embargo, a lo largo de los últimos años se han encontrado evidencias de la participación de los clústeres en este comportamiento magnético anómalo del oro a nivel nanométrico y subnanométrico.^{23, 36}

Como se ha visto anteriormente, el sólido AuCLsE3 está compuesto por clústeres de Au₂, Au₄, Au₆ y Au₉, mientras que el sólido AuCLsE5 está formado por clústeres de Au₂, Au₅, Au₁₀ y Au₁₁. De acuerdo con el modelo del Jellium los clústeres con un número impar de átomos tendrían una configuración electrónica con un electrón desapareado (tabla 5). La muestra AuCLsE3, en que a penas se observaba ninguna señal en el espectro de EPR, está mayoritariamente formada por clústeres de un número par de átomos mientras que la muestra AuCLsE5 está formada por dos clústeres distintos de un número impar de átomos.

Tabla 5. Predicción del modelo del Jellium de la estructura electrónica de los clústeres presentes en el sólido obtenido en la síntesis AuCLsE5.

Clúster	Estructura electrónica
Au ₂	1S ²
Au ₄	1S ² 1P ⁴
Au ₅	1S ² 1P ³
Au ₆	1S ² 1P ⁶
Au ₁₀	1S ² 1P ⁶ 1D ²
Au ₁₁	1S ² 1P ⁶ 1D ³

Estos clústeres con un electrón desapareado serían los responsables del ferromagnetismo observado para la muestra AuCLsE5. Al encontrarse agrupados formando agregados de mayor tamaño, existirá un acoplamiento de sus espines formando una estructura típica de un comportamiento ferromagnético.

Este comportamiento se corroboró mediante una medida de susceptibilidad magnética de la muestra AuCLsE5. En la figura 22 aparecen representados los valores de magnetización obtenidos al variar el campo magnético, donde se observa un comportamiento lineal indicativo de materiales con un comportamiento tipo paramagnético, ferromagnético o superparamagnético.

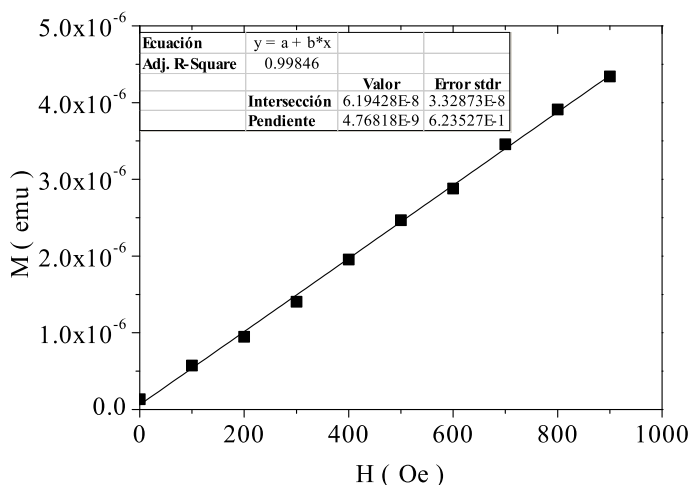


Figura 22. Medida de la susceptibilidad magnética del sólido obtenido en la síntesis AuCLsE5 (■) y su ajuste a una recta (—).

Se realizó un ajuste lineal de los puntos y del valor de la pendiente de la recta se dedujo el valor de la susceptibilidad magnética $\chi = 4.77 \times 10^{-9}$.⁶¹ Este valor pequeño y positivo de la susceptibilidad supone un comportamiento paramagnético. En caso de tratarse de una muestra ferromagnética este valor debería de ser mucho más elevado. Esto puede interpretarse como una confirmación de que la muestra está realmente formada por clústeres paramagnéticos que bajo ciertas circunstancias se agrupan formando dominios ferromagnéticos.

Aunque todos los datos que disponemos apuntan a los clústeres impares como los responsables del paramagnetismo, no se puede descartar totalmente la teoría propuesta por Crespo *et al.* ya que las muestras sintetizadas tienen también moléculas de tior en el medio.⁶⁰ Además no se ha podido descartar por completo la presencia de nanopartículas en la muestra, ya que al disolver el sólido en algunos disolventes se observó una banda que podría corresponder a la banda plasmónica del oro.

1.5 Conclusiones

Se ha realizado una primera aproximación a la síntesis de clústeres de oro mediante un proceso electroquímico. Aunque este método ha resultado especialmente sensible a las condiciones de la síntesis, como es el caso de la limpieza de los electrodos, se han estudiado diferentes factores que afectan a la formación de clústeres como son la densidad de corriente utilizada, el electrolito soporte y el tratamiento posterior realizado a la muestra.

Se ha comprobado que densidades altas de corriente y tiempos largos de síntesis conducen a una menor dispersión de tamaños de los clústeres obtenidos. Con la densidad de corriente más pequeña ($5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) el efecto de la electrodeposición se observa desde los primeros momentos, haciendo que la síntesis sea menos efectiva y conduciendo a la obtención de clústeres de mayor tamaño. Estos estudios condujeron a una densidad de corriente óptima de $10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Además se probaron dos sales diferentes de tetraalquilamonio como electrolito soporte, como son los bromuros de tetrabutilamonio y tetraoctilamonio. Se comprobó que el mayor tamaño de la sal de tetraoctilamonio dificultaba la síntesis, conduciendo a la formación de un menor número de clústeres.

Se observó la evolución de la síntesis con el tiempo y se comprobó la necesidad de tiempos cortos de síntesis, aunque en ningún caso se observó la formación de nanopartículas. En el experimento realizado con una densidad de corriente menor se vio como con el avance de la síntesis los clústeres inicialmente formados de Au_2 y Au_5 daban lugar con el transcurso de la síntesis a Au_2 , Au_3 y Au_{12} .

También se comprobó la evolución de los clústeres obtenidos con el tiempo, observando la formación de los clústeres de Au_2 y Au_4 como los más estables. Con el fin de proteger los clústeres de este envejecimiento se trataron de extraer con dodecanotiol. Aunque no se consiguió preservar la integridad de los clústeres obtenidos inicialmente en la síntesis sí se observó la precipitación de dos sólidos compuestos de clústeres de mayor tamaño. Se llevaron a cabo medidas de EPR de estos sólidos y se encontró que uno de ellos era ferromagnético. Esto se ha visto como una buena señal, porque la síntesis de clústeres como sólidos facilitaría su almacenamiento y operatividad a nivel laboratorio en condiciones más estables que si se tratase de una muestra en disolución, además de permitir su obtención con un grado de pureza mayor, ya que se puede esperar la precipitación selectiva de los clústeres frente a las posibles impurezas que pueda haber en el medio de reacción.

Estos primeros estudios apuntan a los clústeres con un número impar de átomos como los responsables del comportamiento ferromagnético de la muestra, lo que choca con observaciones hechas anteriormente en la bibliografía que apuntan al enlace Au-S como el responsable del comportamiento magnético “anómalo” para el oro.

2

Síntesis de clústeres de oro. Método químico

Mediante la síntesis electroquímica de clústeres de oro se consiguió realizar un control cinético de la reacción, permitiendo la obtención de clústeres de Au_n con $n \leq 20$. Aunque el método electroquímico tiene las grandes ventajas del control del tamaño y la aparente sencillez, la síntesis resultó muy sensible a las condiciones experimentales, sobre todo a la limpieza del material, como el electrodo de trabajo usado en el proceso electroquímico. Los clústeres obtenidos mediante este método mostraron un comportamiento magnético muy prometedor, aunque tras esta primera aproximación quedan pendientes estudios más profundos sobre la procedencia de este comportamiento, así como estudiar de forma más detallada las propiedades intrínsecas de cada clúster individual.

Así que en un segundo enfoque se abordó la síntesis de clústeres de oro mediante otra aproximación “bottom-up” como es el control cinético de la reacción de obtención de nanopartículas de oro desarrollada por Brust.⁶² Este método es una de las rutas sintéticas más comunes para la obtención de nanopartículas de oro protegidas con tioles. En este método se transfieren iones de Au^{3+} , procedentes de la sal HAuCl_4 , de una disolución acuosa a tolueno usando bromuro de tetraoctilamonio como agente de transferencia de fase, a continuación el oro se reduce con borohidruro sódico en presencia de dodecanotiol. Las condiciones de reacción determinan la relación oro/tiol de los agregados finales. De esta forma se obtienen nanopartículas de oro monodispersas como producto mayoritario.

Tras la introducción de este método por Brust en 1994 han sido muchos los esfuerzos realizados por distintos grupos de investigación para reducir el tamaño de las partículas obtenidas mediante la variación de las condiciones de síntesis o la aplicación de distintos métodos de fraccionamiento para la separación de los agregados más pequeños que se obtienen como producto minoritario de la síntesis. Varios grupos encaminaron su interés hacia el estudio de las condiciones de síntesis, como son el alcanotiol utilizado, la concentración y velocidad de adición del reductor y el control de la temperatura.

Un ejemplo de esto se encuentra en el trabajo de Whetten *et al.*,⁶³ que en 1998, mediante un control preciso de la temperatura y añadiendo un gran exceso del reductor (NaBH_4 acuoso) en una sola vez, consiguieron aislar por cristalización fraccionada cinco clústeres de oro de 1 a 2 nm (~40-200 átomos) recubiertos con tioles de distinta estructura.

Un año más tarde Murray *et al.* llevaron a cabo un estudio detallado del efecto de la temperatura y la proporción de tiol con respecto al oro en la síntesis.⁶⁴ Probando temperaturas desde 90 a -78°C y proporciones de $\text{RSH}:\text{AuCl}_4^-$ desde 4:1 a 1:12 encontraron que los clústeres más pequeños se obtenían para las proporciones de tiol más grandes y a las temperaturas más bajas (-78°C).

Otra aproximación propuesta por Whetten *et al.* pasa por el uso del impedimento estérico del tiol para controlar el tamaño, así usaron el dipéptido ditiolado glutatión (figura 23) consiguiendo aumentar la estabilidad de las partículas más pequeñas (desde 1.5 nm) en medios acuosos.⁶⁵ Murray *et al.* además de usar el glutatión, introdujeron la tiopronina, un péptido sintético tiolado, como agente protector de nanopartículas de oro, obteniendo nanopartículas solubles en agua de 1 a 8 nm.⁶⁶ Otro grupo que trabajó más tarde con nanopartículas de oro protegidas con glutatión fue el de Tsukuda *et al.*, que consiguieron aislar clústeres de Au_n con n 18, 21, 25, 28, 32 y 39 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).⁶⁷

Otro enfoque que cabe mencionar para la obtención de clústeres de pequeño tamaño tiolados consiste en el intercambio de ligandos. En esta línea Tsukuda *et al.* aislaron el clúster $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ (siendo SG glutatión) partiendo de $\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3$.⁶⁸

Aunque todos estos ejemplos ilustran las interesantes perspectivas que hay para las nanopartículas más pequeñas, o los clústeres más grandes, las síntesis mencionadas están lejos de la obtención de los clústeres de menor tamaño y en general llevan a la obtención de mezclas polidispersas de clústeres. De hecho el clúster más pequeño observado en estos ejemplos es el de 18 átomos de oro, y esto después de su separación por PAGE de una mezcla compleja.⁶⁷

Varios de estos grupos destacaron la importancia de la presencia de precursores poliméricos Au-SR en el proceso de reacción, que se generarían en la reacción representada en el esquema 2.

Esquema 2. Proceso de formación de los precursores poliméricos AuSR.



Sin embargo no se menciona el papel que pueden jugar los clústeres de un tamaño menor en este proceso de síntesis, que como se ha comprobado, tienen una gran importancia en el proceso de síntesis electroquímico de nanopartículas y que según el mecanismo de formación de clústeres propuesto en nuestro grupo de investigación están presentes en la síntesis de Brust como precursores de las nanopartículas.⁴⁶

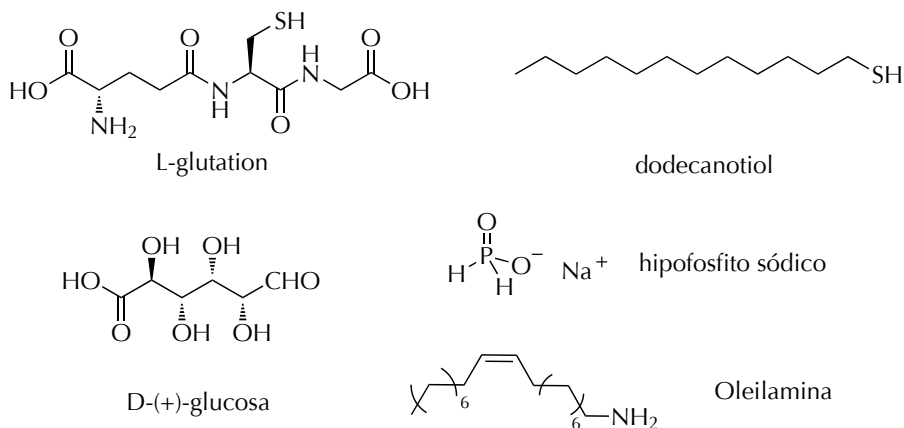


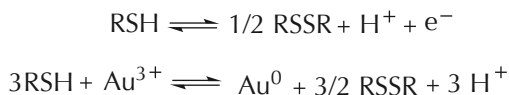
Figura 23. Estructuras de los distintos reductores usados en la síntesis química de clústeres de oro.

El control de la cinética que se propone en este trabajo pasa por el uso de reductores más suaves que el borohidruro sódico usado por Brust y en los trabajos anteriormente mencionados, así como distintos agentes de transferencia de fase adecuadas a las condiciones de reacción en cada caso.

Los reductores que se probaron fueron el dodecanotiol, D-glucosa, oleilamina, hipofosfito sódico y glutatión. Sus estructuras se pueden ver en la figura 23.

Teniendo en cuenta la bibliografía manejada una de las elecciones más lógicas para usar como reductor fue un tiol. Debido a la gran afinidad de este grupo por los metales de transición (es una base blanda de Pearson,^{69, 70} mientras que los metales de transición son ácidos blandos) son los agentes protectores más extendidos en la síntesis de nanopartículas, especialmente de oro.⁷¹ Tienen tendencia a formar enlaces disulfuro, oxidándose y pudiendo actuar como agentes reductores a la vez que actúan como agente protector, según la reacción del esquema 3.

Esquema 3. Proceso de oxidación de tioles.



El dodecanotiol es, dentro de los tioles, uno de los más usados debido a su bajo coste y a su larga cadena alquílica, que facilita la extracción a disolventes orgánicos.

Por su parte el glutatión es un tripéptido tiolado voluminoso, muy abundante en las células vivas. Entre otras, tiene la función de mantener el potencial celular en un estado reductor, protegiendo las estructuras biomoleculares del daño por oxidación. Otra característica que lo hace interesante para la síntesis de nanopartículas es su carácter anfótero, que permite cambiar su solubilidad en medios orgánicos y acuosos mediante el control del pH.

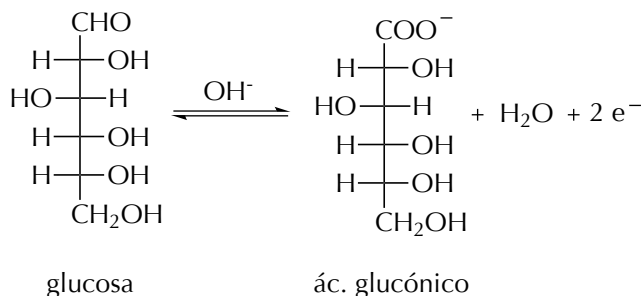
Aunque no es tan frecuente, existen precedentes en la bibliografía del uso de glúcidos como reductores en la síntesis de nanopartículas, sobre todo dentro de la química verde.^v Por ejemplo, el uso de la glucosa como reductor para la

^v Química dirigida hacia el diseño de productos y procesos químicos reduciendo el uso de productos peligrosos para el medio ambiente y las personas.

síntesis de partículas de plata, o la obtención de nanopartículas de oro por reducción con quitosano (polisacárido formado por glucosaminas).^{72, 73}

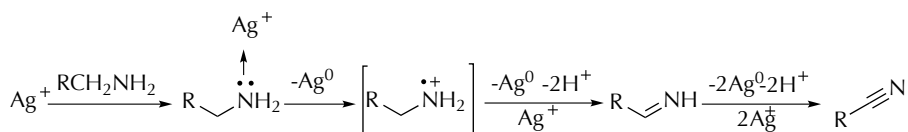
La glucosa se oxida para dar lugar al ácido glucónico, según la reacción que se indica en el esquema 4.

Esquema 4. Proceso de oxidación de la glucosa.



La oleilamina es una amina alifática que puede dar lugar a nitrilos mediante oxidación inducida por metales. Fue usada por primera vez como agente reductor y protector de partículas de oro y plata por Hiramatsu *et al.*⁷⁴ Más tarde Chen *et al.* propusieron un mecanismo para la reacción de reducción en la síntesis de nanopartículas de plata (esquema 5).⁷⁵

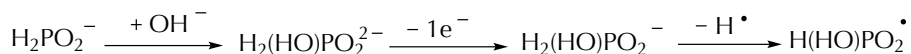
Esquema 5. Mecanismo de oxidación de la oleilamina.



Por último, el uso del hipofosfito sódico en la síntesis de nanopartículas metálicas es poco común y su mecanismo de reacción no ha sido muy estudiado. Se ha usado sobre todo para la síntesis de partículas de níquel y fosfato de níquel y en algún ejemplo para la obtención de nanopartículas de cobalto.^{76, 77} Nakai *et al.* propusieron a través de cálculos teóricos un mecanismo basado en la adición inicial de un ión hidroxilo al fósforo seguida de la pérdida del radical $\text{H}\cdot$ (esquema 6), además comprobaron que esta

reacción de oxidación se ve favorecida en una superficie metálica de paladio, coordinándose los oxígenos del hipofosfito con clústeres de cuatro átomos del metal.⁷⁸

Esquema 6. Mecanismo de oxidación del hipofosfito.



En la tabla 6 aparecen los valores de los potenciales normales encontrados en la bibliografía para la reducción del tetracloroaurato, así como el del borohidruro sódico y los distintos reductores propuestos.

Tabla 6. Potenciales normales de reducción.

Semireacción	E ⁰ /V	Condiciones	Ref.
AuCl ₄ ⁻ /Au(s)	+0.93	25°C, 1 atm, 1M	139
BO ₂ ⁻ /BH ₄ ⁻	-1.24	25°C, 1 atm, 1M	135
GSSG/GSH	-0.26	25°C, 1 atm, pH 7 tampón fosfato, frente al sistema de referencia NaDPH/NADP+	138
RSSR/RSH	-0.26	25°C, 1 atm, pH 7 tampón fosfato, frente al sistema de referencia del mercaptoetanol	136
H ₂ PO ₃ ⁻ /H ₂ PO ₂ ⁻	-1.57	25°C, 1 atm, pH 14	137
	-0.5	25°C, 1 atm, pH 0	137

Como se puede ver, el borohidruro es un reductor mucho más fuerte que el resto, a excepción del hipofosfito a pH muy básico. En todos los casos el potencial resulta suficiente para la reducción del oro.

La síntesis del método de Brust es un proceso de catálisis bifásica, por eso es necesario añadir un agente de transferencia de fase que se asocia a los aniones de tetracloroaurato de la fase acuosa y los extrae a la fase orgánica. El reductor se añade entonces disuelto en agua y la reacción se produce de una forma

lenta y controlada a través de las microgotas que se forman al mezclar ambas fases con una fuerte agitación mecánica.

Normalmente se usan como agentes de transferencia de fase sales de amonio o fosfonio cuaternarias, que catalizan la reacción debido a la mala solvatación del tetracloroaurato en el disolvente orgánico, lo que disminuye su energía de activación, y a que el par iónico se encuentra débilmente asociado y no impide el que la reacción tenga lugar.

Así que la elección del agente de transferencia de fase es también un factor a tener en cuenta a la hora de favorecer la formación de los clústeres de oro mediante este método. En este trabajo se usaron dos sales de tetrabutilamonio y se jugó con el volumen del contraanión usando bromuro y acetato.

2.1 Procedimiento general de síntesis

Las condiciones de cada experimento están resumidas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones generales de las síntesis químicas de clústeres de oro. **ATF** agente de transferencia de fase, **TBABr** bromuro de tetrabutilamonio, **TBAAc** acetato de tetrabutilamonio.

Experimento	ATF	Reductor
AuCLsQ1	TBABr	dodecanotiol
AuCLsQ2	TBABr	D-glucosa
AuCLsQ3	TBABr	NaPO ₂ H ₂ ·H ₂ O
AuCLsQ4	TBABr	oleilamina
AuCLsQ5	TBAAc	glutation

En todos los experimentos se añadió una disolución de la sal de tetraalquilamonio 50 mM en tolueno sobre una disolución acuosa de HAuCl₄ 30 mM. Las dos fases se agitaron enérgicamente hasta que el tetracloroaurato se extrajo completamente de la fase acuosa a la fase orgánica (esto se comprueba fácilmente por los cambios de color en las dos fases).

A continuación, se añadió el reductor (de 0.3 a 3 equivalentes) y se agitó la mezcla hasta el día siguiente.

El uso de la oleilamina como agente reductor se descartó tras llevar a cabo la reacción, en estas condiciones (experimento AuCLsQ4) se observó la formación de una emulsión entre las dos fases difícil de deshacer y que imposibilitó el seguimiento de la reacción. Debido a la estructura de la oleilamina, con una parte hidrófoba y una cabeza polar, es probable que haya funcionado como surfactante, ayudando a la formación y estabilización de la emulsión entre la fase acuosa y orgánica.

En la síntesis AuCLsQ5 se cambió el agente de transferencia de fases, de bromuro a acetato de tetrabutilamonio para promover el recubrimiento de los clústeres con el glutatión. Anteriormente en el laboratorio se había observado la elevada tendencia de los clústeres a recubrirse con iones haluro y el acetato tiene una menor afinidad por el oro que el bromuro.^{vi}

En todos los casos se observó la precipitación de un sólido naranja en la interfase agua/tolueno, excepto en la síntesis AuCLsQ5 en que no se apreció ningún cambio en el color de las dos fases hasta dos días después. En ese momento la fase acuosa adquirió una coloración violeta, precipitando un sólido del mismo color, soluble en agua a pH básico, una primera prueba de la unión del glutatión a los clústeres.

Los distintos sólidos obtenidos fueron aislados por ultracentrifugación, separándolos así del medio de reacción para su posterior caracterización.

2.2 Caracterización

Los sólidos obtenidos se caracterizaron mediante espectroscopía de absorción UV-vis tras disolverlos en cloroformo (figura 24).

En los espectros de las muestras AuCLsQ1, AuCLsQ2 y AuCLsQ3 hay dos bandas comunes a 253-260 nm y 399-407 nm, correspondientes a clústeres

^{vi} De acuerdo con la teoría de Pearson, el oro es un ácido blando, con una mayor afinidad por bases blandas. Las ácidos y bases blandas se caracterizan por ser más grandes y más polarizables que los ácidos y bases duros, según esta teoría el bromuro sería una base blanda mientras que el acetato sería una base dura.

de dos y diez átomos de oro, respectivamente.^{vii} Además, en cada una de estas síntesis se observan otras bandas asociadas a distintos clústeres, en AuCLsQ1 Au₆ (351 nm), en AuCLsQ2 Au₄ (322 nm) y en AuCLsQ3 Au₅ (335 nm) y Au₇ (366 nm).

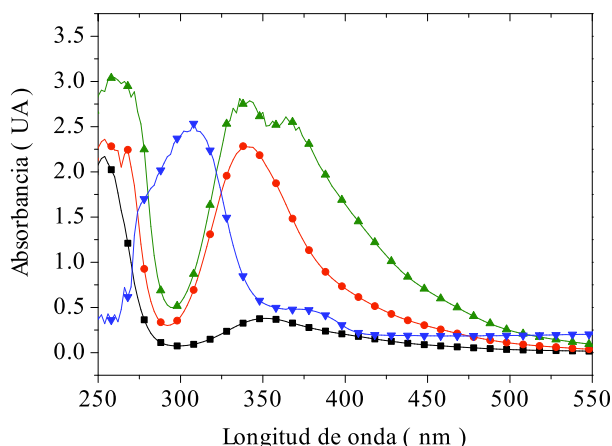


Figura 24. Espectro de absorción UV-vis de los sólidos obtenidos en las síntesis AuCLsQ1 (■), AuCLsQ2 (●), AuCLsQ3 (▲) y AuCLsQ5 (▼).

En el caso del sólido violeta obtenido en la síntesis AuCLsQ5 el espectro es muy distinto, con la presencia de tres bandas a 286, 311 y 379 nm, correspondientes a clústeres de Au₃, Au₄ y Au₈.

Los clústeres presentes en cada muestra están resumidos en la tabla 8. En todos los casos se obtuvieron clústeres de Au_n con $n \leq 10$. Las síntesis AuCLsQ1 y AuCLsQ2 condujeron a la formación de clústeres con un número par de átomos, mientras que en las otras dos síntesis se obtuvo una mezcla de clústeres pares e impares.

La obtención de los clústeres como sólidos facilitó el estudio de la composición de las muestras mediante distintas técnicas.

^{vii} El ajuste y la asignación de los picos a número de átomos de oro por clúster se hizo de forma análoga al capítulo 1, primero se hizo un ajuste lorentziano para la determinación de los máximos de absorción y a continuación se calculó el número de átomos de oro mediante el modelo del Jellium.

Tabla 8. Asignación de los máximos de absorción de los sólidos obtenidos en cada experimento.

Experimento	Máximo de absorción/nm	Clústeres
AuCLsQ1	255, 351, 400	Au ₂ , Au ₆ , Au ₁₀
AuCLsQ2	253-268, 322,399	Au ₂ , Au ₄ , Au ₁₀
AuCLsQ3	260, 335, 366, 407	Au ₂ , Au ₅ , Au ₇ , Au ₁₀
AuCLsQ5	286, 311, 379	Au ₃ , Au ₄ , Au ₈

Por una parte se estudió la composición de los clústeres sintetizados mediante análisis elemental y fluorescencia de rayos X, comprobando la presencia de oro, bromo, carbono, hidrógeno y nitrógeno en los sólidos de los experimentos AuCLsQ1, AuCLsQ2 y AuCLsQ3. Como se puede ver la tabla 9 en las síntesis AuCLsQ1 y AuCLsQ2 en ambos sólidos aparece un átomo de bromo y una molécula de TBA por átomo de oro, si se comparan las proporciones de nitrógeno, carbono e hidrógeno con los calculados para la molécula de TBA.

Tabla 9. Proporción de los distintos elementos calculados para los sólidos, por átomo de oro a partir de los datos de % en peso de análisis elemental y fluorescencia de rayos X.

Experimento	Au	Br	C	H	N
AuCLsQ1	1	2	17	37	1
AuCLsQ2	1	2	18	42	1
AuCLsQ3	1	3	—	—	—
TBA calculado	—	—	16	36	1

Esto se comprobó también por espectroscopía IR. Los espectros de los sólidos de las síntesis AuCLsQ1, AuCLsQ2 y AuCLsQ3 mostraron la presencia del agente de transferencia de fase TBABr (figura 25).

En los espectros se puede ver como en todos los casos están presentes las bandas más relevantes del agente de transferencia de fase, aunque con ciertas diferencias que pueden ser debidas a la coordinación del catión TBA con los átomos de oro.

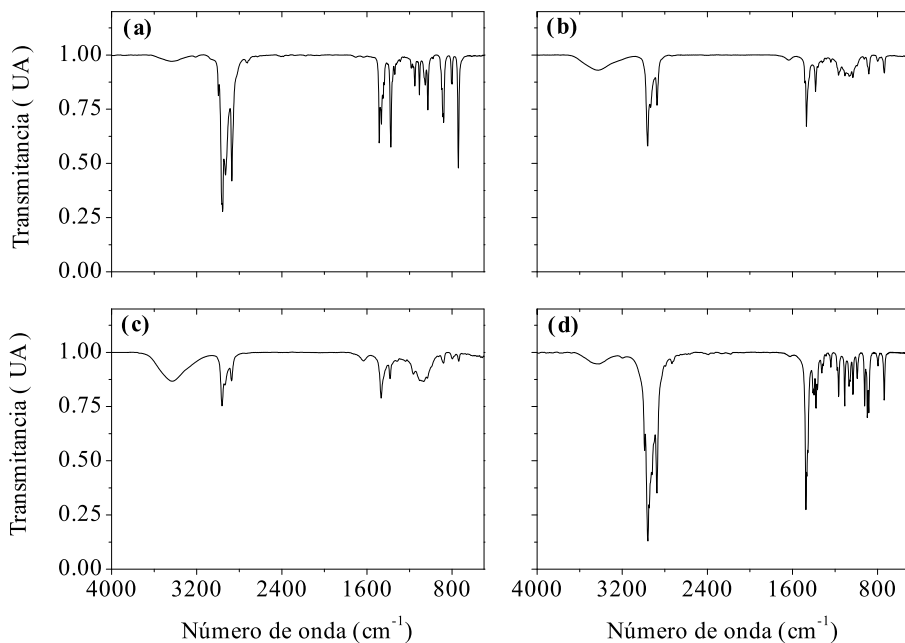


Figura 25. Espectros IR de los sólidos **(a)** AuCLsQ1, **(b)** AuCLsQ2, **(c)** AuCLsQ3 y **(d)** del TBA Br.

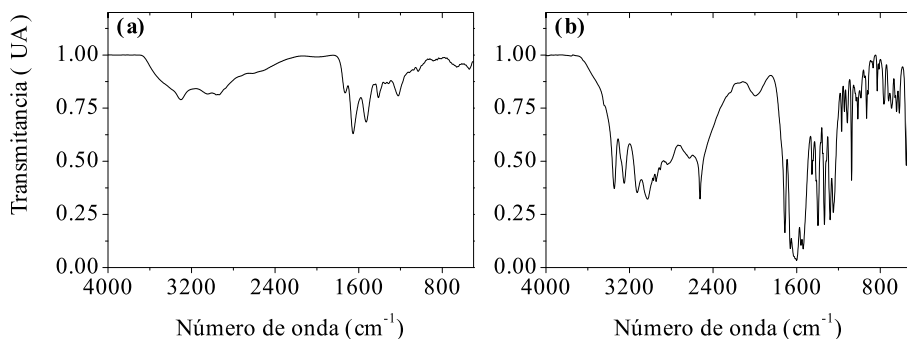







Figura 26. Espectros IR **(a)** del sólido obtenido en la síntesis AuCLsQ5 y **(b)** del glutatión.

En el espectro IR del sólido de la síntesis AuCLsQ5 no se observan las bandas del catión tetrabutylamonio, sin embargo, aunque el espectro no es de muy buena calidad, el espectro es similar al del glutatión (figura 26).

La presencia de clústeres en los sólidos se verificó mediante espectroscopía Raman, basándonos en el trabajo de Ding *et al.*, en que mediante estudios de DFT optimizaron la geometría de clústeres de dos a seis átomos de oro y calcularon la frecuencia de vibración de los enlaces Au-Au.^{viii} En su estudio encontraron que en todos los casos la frecuencia de vibración de estos enlaces era pequeña ($<200\text{ cm}^{-1}$).⁷⁹ En la tabla 10 aparecen listadas las frecuencias, así como la estructura optimizada en cada caso.

Tabla 10. Estructuras y frecuencias de vibración Au-Au de los clústeres Au_n , $n=2-6$. Unidades cm^{-1} publicadas por Ding *et al.*⁷⁹ Los números entre paréntesis indican el número de vibraciones que aparecen con ese valor.

	Au₂	Au₃	Au₄	Au₅	Au₆
Au ₂ 	162	17	13	21	31 (2)
Au ₃ 		110	31	32	34
		150	72	43	52 (2)
Au ₄ 			75	59	74 (2)
			147	82	96
Au ₅ 			177	93	113
				115	123
Au ₆ 				128	167 (2)
				162	

^{viii} DFT (density functional theory): La teoría del funcional de la densidad es un procedimiento vibracional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, en el que el parámetro a optimizar es el funcional que relaciona la distribución de densidad electrónica con la energía del sistema. Es uno de los métodos más utilizados en los cálculos cuánticos de la estructura electrónica de la materia.

Los espectros Raman de los sólidos AuCLsQ1, AuCLsQ2 y AuCLsQ3 coinciden con el del TBABr, exceptuando en la zona de baja energía, en que se observan nuevos picos (figuras 27, 28 y 29). Estas nuevas bandas no coinciden con ninguno de los reactivos usados en la síntesis y se encuentran en la zona propuesta por Ding *et al.* para los enlaces Au-Au.

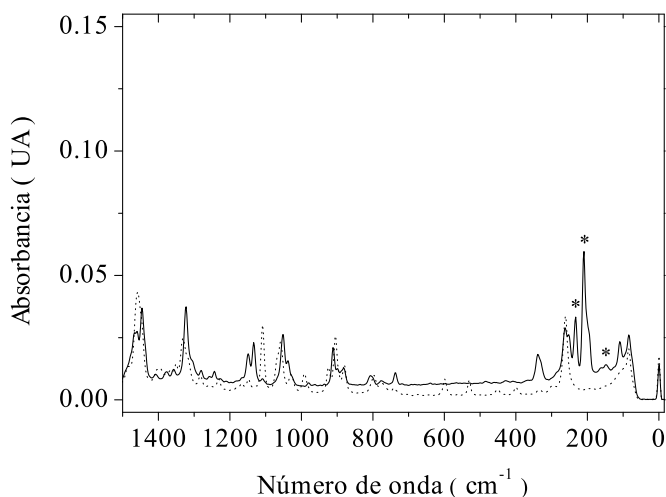


Figura 27. Comparativa del espectro Raman en la zona de baja energía de la muestra AuCLsQ1 (—) y el TBABr (...). Señalados sobre el espectro los picos nuevos (*).

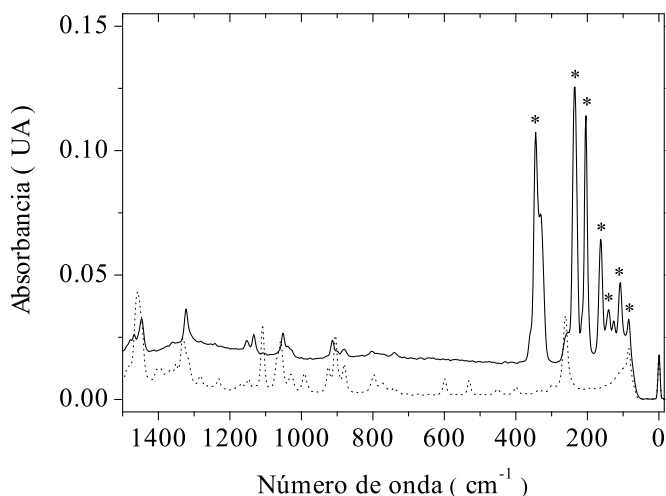


Figura 28. Comparativa del espectro Raman en la zona de baja energía de la muestra AuCLsQ2 (—) y el TBABr (...). Señalados sobre el espectro los picos nuevos (*).

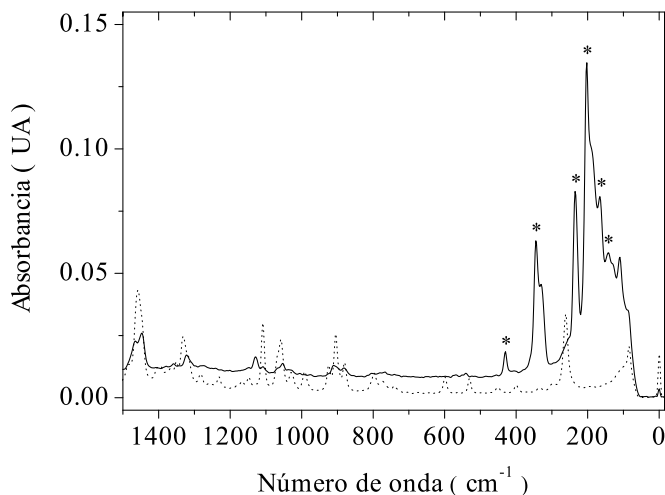


Figura 29. Comparativa del espectro Raman en la zona de baja energía de la muestra AuCLsQ3 (—) y el TBABr (...). Señalados sobre el espectro los picos nuevos (*).

En el caso del sólido AuCLsQ5, sin embargo, el espectro obtenido es demasiado malo como para poder observar ninguna banda (figura 30).

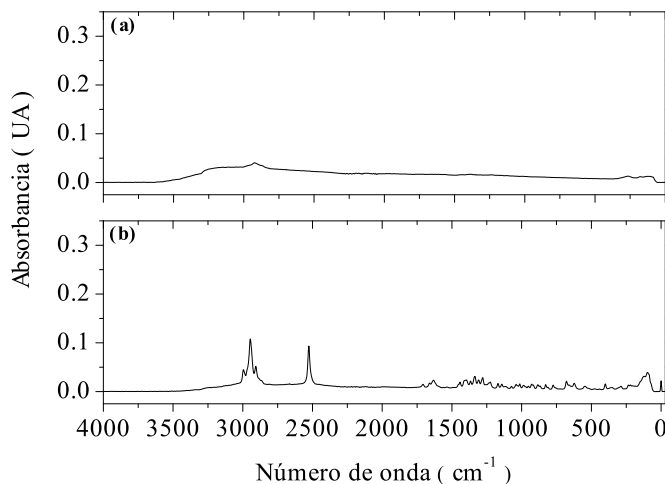


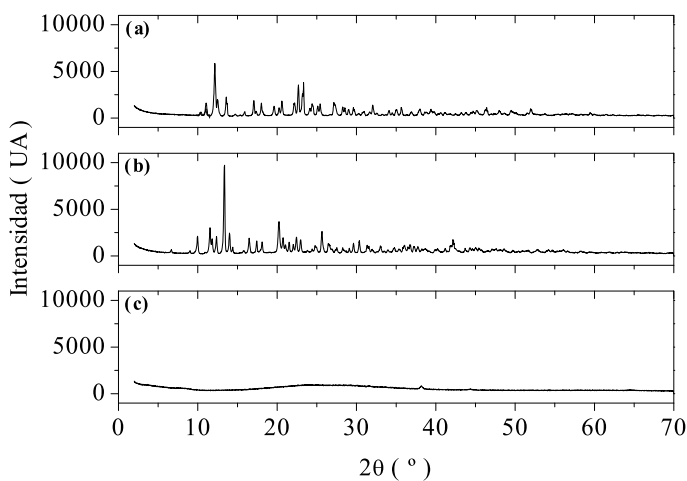
Figura 30. Comparativa del espectro Raman (a) de la muestra AuCLsQ5 y (b) el glutatión.

En la tabla 11 aparecen resumidos los nuevos picos encontrados en los espectros Raman de las muestras AuCLsQ1, AuCLsQ2 y AuCLsQ3. Aunque no es fácil la asignación inequívoca de cada banda o grupo de bandas a un clúster determinado, resulta indicativo de la presencia de enlaces Au-Au.

Tabla 11. Número de onda de las bandas obtenidas en los espectros Raman de las distintas muestras.

Experimento	Bandas Raman/cm ⁻¹
AuCLsQ1	149, 209, 232
AuCLsQ2	107, 126, 140, 163, 203, 234, 344
AuCLsQ3	110, 127, 142, 166, 186, 202, 235, 330, 345, 429

Se descartó la presencia de oro metálico mediante difracción de rayos X de polvo cristalino. Como se puede ver en la figura 31 no aparecen todos los picos del oro.^{ix} Si bien a ángulos bajos es difícil de discernir la ausencia de parte de los picos descarta la presencia de oro metálico. En el caso de las síntesis AuCLsQ1 y AuCLsQ2 el patrón de difracción es muy similar al de la estructura cristalina del bromuro de tetrabutilamonio.

**Figura 31.** Espectros de difracción de rayos X de polvo cristalino de las muestras (a) AuCLsQ1, (b) AuCLsQ3 y (c) AuCLsQ5.

^{ix} Los valores de 2θ para el oro son: 38.22, 44.43, 64.64, 77.65 y 81.81, según la base de datos “American Mineralogist Crystal Structure Database”.

2.3 Propiedades magnéticas

En este caso, al igual que en los clústeres obtenidos mediante el método electroquímico, se estudiaron las propiedades magnéticas de los distintos sólidos mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR). Los sólidos obtenidos en los experimentos AuCLsQ1 y AuCLsQ2 son diamagnéticos mientras que los correspondientes a los experimentos AuCLsQ3 y AuCLsQ5 presentan una señal centrada a $g=2.01$ que indica que son paramagnéticos (figura 32). La señal es más intensa para el sólido AuCLsQ3.^x

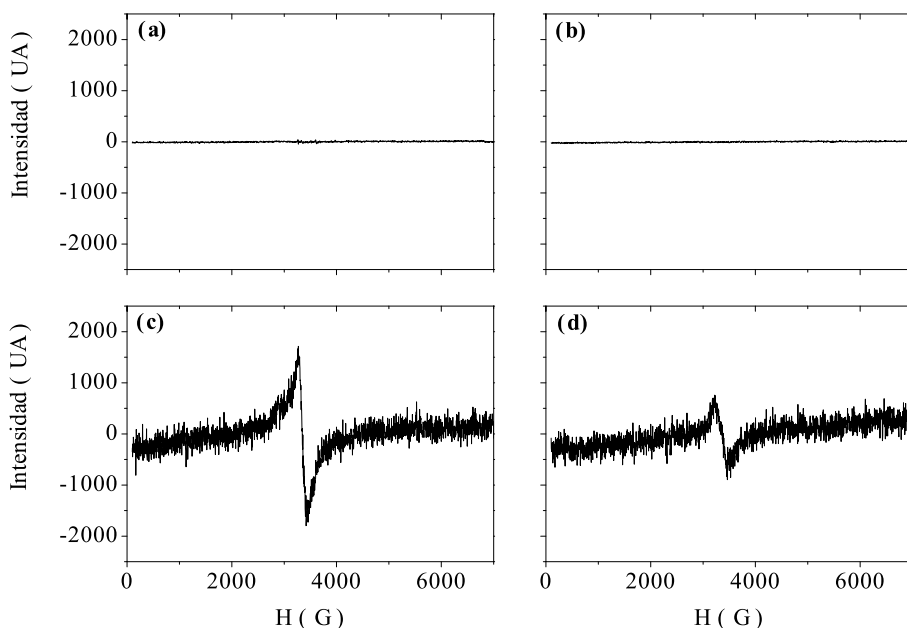


Figura 32. EPR a 300 K y 9.424 GHz de las muestras **(a)** AuCLsQ1, **(b)** AuCLsQ2, **(c)** AuCLsQ3 y **(d)** AuCLsQ5.

Relacionando los clústeres presentes en cada muestra con su comportamiento magnético (tabla 12) se puede deducir fácilmente que, de nuevo, las muestras diamagnéticas están formadas por clústeres con un número par de átomos,

^x El cálculo del factor g de Landé se hizo de la misma forma que en el capítulo 1, según la fórmula: $g = \hbar v / \mu_B H$.

mientras que las muestras paramagnéticas contienen los clústeres Au₃, Au₅ y Au₇ con un número impar de átomos.

Tabla 12. Resumen de las propiedad ópticas y magnéticas de los clústeres obtenidos en cada síntesis.

Muestra	Máximo de absorción/nm								Magn.
	Au ₂	Au ₃	Au ₄	Au ₅	Au ₆	Au ₇	Au ₈	Au ₁₀	
AuCLsQ1	255	—	—	—	351	—	—	400	No
AuCLsQ2	253/268	—	322	—	—	—	—	399	No
AuCLsQ3	260	—	—	335	—	366	—	407	Sí
AuCLsQ5	—	286	311	—	—	—	379	—	Sí

Al igual que se explicó para el caso de la muestra de clústeres ferromagnéticos obtenidos electroquímicamente, este comportamiento se puede explicar en base a la estructura electrónica derivada del modelo del Jellium (tabla 13). Los clústeres Au₃, Au₅ y Au₇ son los únicos en tener un electrón desapareado responsable del paramagnetismo. Si se recuerda el espectro de absorción UV-vis de los sólidos AuCLsQ3 y AuCLsQ5 (figura 24) el máximo de absorción debido al clúster de Au₃ es mucho más intenso que el de los clústeres Au₅ y Au₇ lo que explicaría la diferencia de intensidades del espectro EPR.

Como ya se comentó, Crespo *et al.* fueron los primeros en publicar este comportamiento magnético singular para nanopartículas de oro recubiertas con un tiol,⁶⁰ proponiendo al enlace S-Au como responsable de originar el paramagnetismo en las nanopartículas de oro, esta interacción sería la responsable de la localización de los electrones de conducción y la desaparición de la banda plasmónica. Con estos nuevos resultados, apoyando a los obtenidos en la síntesis electroquímica de clústeres de oro, podemos asegurar que no hay una relación directa entre el recubrimiento de las partículas y el magnetismo. Las muestras AuCLsQ3 y AuCLsQ5 son ambas

paramagnéticas pero sólo en el caso de la última hay un tiol presente en la síntesis, aunque ni siquiera en este caso se observó la presencia del dodecanotiol en la muestra final. Además, en el caso de la muestra AuCLsQ2, en que se usó dodecanotiol, esta muestra resultó diamagnética. Por otra parte en este trabajo ninguna de las cuatro muestras sintetizadas, magnéticas o no, presenta banda plasmónica, señalando la ausencia total de nanopartículas.

Tabla 13. Estructura electrónica propuesta de los clústeres sintetizados derivada del modelo del Jellium.

Clúster	Estructura electrónica	Número total de electrones/ Número de electrones desapareados
Au ₂	1S ²	2/0
Au₃	1S² 1P¹	3/1
Au ₄	1S ² 1P ²	4/0
Au₅	1S² 1P³	5/1
Au ₆	1S ² 1P ⁴	6/0
Au₇	1S² 1P⁵	7/1
Au ₈	1S ² 1P ⁶	8/0
Au ₁₀	1S ² 1P ⁶ 1D ²	10/0

La muestra AuCLsQ3 resultó tener una mayor señal de EPR, así que adicionalmente se estudió el comportamiento de esta señal con la temperatura, haciendo medidas desde 120 K (-153°C) hasta 300 K (27°C) cada 10 K. En la figura 33 aparecen únicamente representadas algunas de estas medidas, se puede ver cómo al ir aumentando la temperatura la señal disminuye.

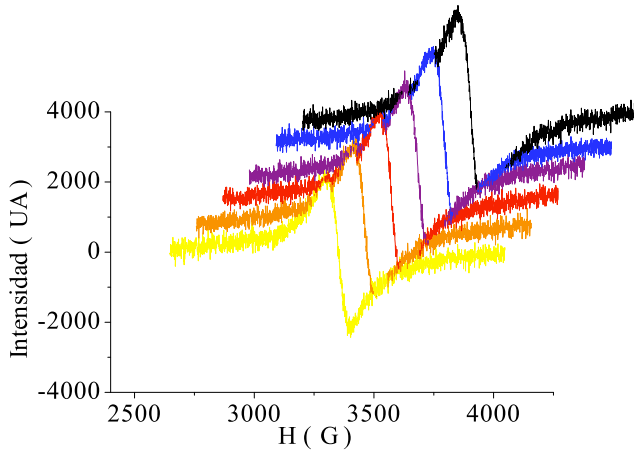


Figura 33. Evolución de la señal de EPR de la muestra AuCLsQ3 con la temperatura: de detrás a delante 120, 160, 200, 240, 280 y 300 K.

Se calculó el área de la señal según se muestra en la figura 34, para representar la intensidad en EPR frente a la temperatura. Se siguió la ecuación 5, donde la altura del pico es $H = M_y + |m_y|$, el ancho es $W = m_x - M_x$ y $M(M_x, M_y)$ es el máximo, mientras que $m(m_x, m_y)$ es el mínimo.

$$I = H \cdot W^2 \quad (5)$$

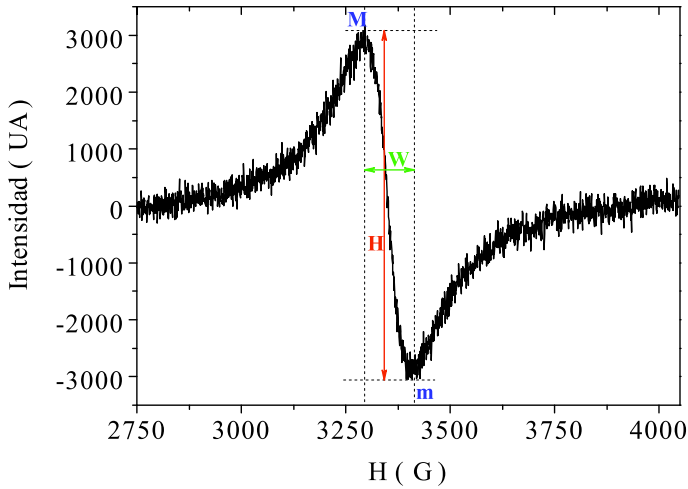


Figura 34. Cálculo de la intensidad de la señal de EPR.

Calculando y representando los valores de I y $1/I$ para cada temperatura se obtienen las gráficas que se pueden ver en la figura 35.

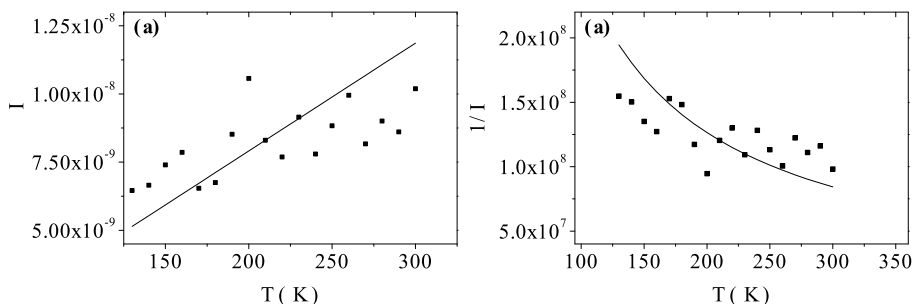


Figura 35. Variación de la señal de EPR con la temperatura de la muestra AuCLsQ3, resultado experimental (■) y ajuste teórico (—) para un electrón desapareado. (a) I vs T y (b) $1/I$ vs T .

El hecho de que no ajuste al comportamiento teórico de un electrón desapareado (paramagnético puro) puede ser debido a que la muestra está formada por una distribución de tamaños de clústeres distintos y por tanto es de esperar que su respuesta magnética sea compleja.

2.4 Conclusiones

Se ha llevado a cabo la síntesis química de clústeres de oro, probando distintos reductores suaves (**dodecanotiol**, **D-glucosa**, **hipofosfito sódico**, **oleilamina** y **glutación**) con el fin de reducir la velocidad de la reacción, pararla en las primeras etapas y conseguir la formación de clústeres de pequeño tamaño.

El uso de la oleilamina se descartó desde el principio porque se observó que favorecía la formación de una emulsión difícil de deshacer.

Con el resto de reductores se consiguieron sintetizar cuatro sólidos compuestos de clústeres de Au_2 a Au_{10} . Los clústeres obtenidos aparecen recubiertos con moléculas del agente de transferencia de fase usado (TBABr), incluso aún cuando existe dodecanotiol en el medio, esto contrasta con el hecho de la gran afinidad de las nanopartículas de oro por los grupos tiol y aporta nuevas pruebas de las distintas propiedades de los clústeres de pequeño tamaño frente a las partículas de un tamaño mayor.

Mediante el uso del glutatión y modificando el contraanión del agente de transferencia de fase se consiguió recubrir los clústeres con este tiol, contando así con una muestra de clústeres de oro cuya solubilidad en medios acuosos y orgánicos se puede modificar mediante la variación del pH del medio.

Se realizaron medidas de las propiedades magnéticas de los sólidos y se pudo verificar que el paramagnetismo de los clústeres viene determinado por la presencia de clústeres de un número impar de átomos, con un electrón desapareado según la estructura electrónica derivada del modelo del Jellium, descartando por completo la teoría propuesta por Crespo *et al.* que atribuía el magnetismo observado para nanopartículas de oro a la interacción Au-S entre las nanopartículas y el tiol usado como agente protector.

3

Purificación de clústeres mediante HPLC

Como se ha visto anteriormente, las propiedades de las partículas metálicas coloidales son dependientes de su tamaño, siendo esta dependencia especialmente relevante en el caso de los clústeres. A pesar de que se ha conseguido reducir la dispersión de tamaños (como se puede ver en los capítulos anteriores), todavía se obtienen mezclas de clústeres. Así que resulta importante disponer de algún método de purificación para poder entender mejor el origen de la relación entre las propiedades y el tamaño, pudiendo así caracterizar y estudiar las propiedades de los clústeres individuales de una forma inequívoca. Esto es también importante para las aplicaciones prácticas de los clústeres, ya que el tenerlos más puros se puede controlar sus propiedades más fácilmente.

Son muchas las técnicas utilizadas en la bibliografía para la purificación de nanopartículas y clústeres de oro. Destacan las técnicas cromatográficas en su uso para la separación de las partículas más pequeñas, como son las cromatografías de exclusión por tamaños y la electroforesis de gel de poliacrilamida.^{34, 80-84}

El problema a la hora de usar este tipo de técnicas suele ser la adsorción irreversible del analito. La electroforesis se propuso como una solución para este problema y aunque ha sido usada con éxito por separado por los grupos de investigación de Whetten y Tsukuda, presenta el problema de la engorrosa recuperación de las fracciones obtenidas.^{34, 84} Wei *et al.* propusieron por su parte el uso de la cromatografía de exclusión por tamaños con un surfactante para solucionar estas cuestiones,^{80, 81} sin embargo, al tratarse de una fase

estacionaria que selecciona en función del radio hidrodinámico de los agregados es más adecuado para partículas grandes en que las diferencias de tamaño son significativas. En el caso de los clústeres, que tan sólo se diferencian en unos pocos átomos, la diferencia de tamaño no es suficiente para este tipo de cromatografía.

Aunque cada uno de los métodos cromatográficos tiene sus ventajas e inconvenientes, en esta tesis se planteó usar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, a la vista de su amplio uso en la bibliografía, tanto en la separación de clústeres metálicos catiónicos de oro,⁸⁵ como de nanopartículas del mismo metal.^{55, 86-90} En esto último destacan los trabajos realizados por el grupo de Murray *et al.* que lograron con éxito la separación de nanopartículas de oro cubiertas de tioles mediante HPLC en fase reversa, usando una columna de sílice C8 (sílice unida a grupos C_8H_{17}) con distintos eluyentes y con la ayuda de distintos sistemas de detección como absorción UV-vis,⁵⁵ electroquímica⁸⁷ y voltametría cíclica.⁸⁸

Uno de los grandes atractivos de esta cromatografía es su gran poder de resolución, además de que acoplada adecuadamente a uno o varios sistemas de detección puede proporcionar in situ mucha información sobre las distintas fracciones de las que se compone la muestra.

En la cromatografía líquida en fase reversa la fase estacionaria es apolar. Habitualmente el relleno consiste en sílice tratada con RMe_2SiCl , siendo R una cadena alquílica con distintas longitudes, las más comunes son $C_{18}H_{37}$ (**C18**) y C_8H_{17} (**C8**). Los parámetros más importantes dentro de una separación son el diámetro interno de la columna, que determinará la cantidad de muestra que se puede separar, y el tamaño de las partículas que conforman el relleno de la columna, cuanto menor sea el tamaño mayor será la superficie de contacto con el analito y la presión de la bomba.

Las condiciones a optimizar para una muestra determinada son las siguientes:

- **Fase estacionaria.** Las más típicas son C8 y C18. Aunque actualmente existen rellenos comerciales con una gran variedad de funcionalidades, como grupos amino, sustituyentes de carácter ácido o básico, etc.
- **Fase móvil.** Para la cromatografía líquida en fase reversa los disolventes más típicos son agua, metanol y acetonitrilo. El agua puede contener además algún

tampón de pH para facilitar la elución.

- **Tipo de elución.** Puede ser isocrática, la composición de la fase móvil se mantiene constante a lo largo de toda la separación, o en gradiente, se va variando la composición de forma progresiva. Normalmente en condiciones en gradiente se consigue una mayor resolución de la muestra.

- **Flujo de la fase móvil.** Suele ser dependiente del tipo de columna.

- **Volumen de inyección de la muestra.** El valor óptimo viene determinado, al igual que para el flujo de la fase móvil, por el tipo de columna utilizada.

El objetivo de este trabajo consistió, por tanto, en la optimización del método de purificación por HPLC en fase reversa de distintas muestras de clústeres sintetizadas en nuestro laboratorio. En general se eligieron muestras de clústeres de oro, plata y cobre fluorescentes. Por una parte porque al disponer de los dos detectores, de absorción y fluorescencia, resulta más fácil a la hora de resolver los cromatogramas si se dispone de más información. Además, también resultan especialmente interesantes a nivel aplicado como alternativa a los “quantum dots” como marcadores biológicos. En general la fluorescencia es un proceso complejo y difícil de explicar, tanto más si la muestra fluorescente se compone de una mezcla de compuestos electrónica y estructuralmente distintos, como es el caso de las muestras de clústeres que se trataron en este trabajo. La separación de los distintos clústeres de una mezcla fluorescente supondría un paso importante para elucidar los mecanismos por los que se produce la fluorescencia en cada caso, así como para poder contar con muestras más puras y con propiedades más controladas.

3.1 Condiciones y procedimientos generales

Para la separación de las distintas muestras de clústeres por HPLC se usó una bomba Waters 600 capaz de elución en gradiente con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2998 PDA acoplado a un detector de fluorescencia de multi- λ Waters 2475.

Para la optimización de cada muestra, inicialmente se usaron columnas analíticas de 4.6×150 mm con rellenos de C18 y amino. Todas las inyecciones se realizaron por duplicado para comprobar la reproducibilidad del método. Además se realizaron inyecciones del blanco de cada muestra en cada caso para

eliminar los picos debidos al disolvente o subproductos de síntesis y así asegurar la asignación de las fracciones. En general este blanco se preparó en el mismo disolvente y con los reactivos usados en cada síntesis, exceptuando el compuesto metálico precursor de los clústeres y el compuesto reductor.

Una vez optimizadas las condiciones de separación se procedió al escalado de las muestras que se consideraron más relevantes (en base a la separación o las propiedades de las muestras) en columnas preparativas de 21.2×250 mm del mismo relleno y con la misma fase móvil. El escalado del volumen de inyección se hizo siguiendo las indicaciones de las columnas, según el factor de escalado (FE) calculado a partir de la ecuación 6, siendo d_1 , L_1 el diámetro y la longitud de la columna inicial (analítica) y d_2 , L_2 el diámetro y la longitud de la columna final (preparativa):

$$FE = \left(d_2/d_1\right)^2 \left(L_2/L_1\right) \quad (6)$$

$$FE = \left(21.2/4.6\right)^2 \left(250/150\right) = 35.4$$

Las columnas analítica y preparativa usadas en todas las separaciones fueron del mismo tamaño, así que el factor de escalado fue 35.5, el mismo en todos los casos. De esta forma a la hora de realizar una separación en la columna preparativa se calcularon el flujo y el volumen de inyección multiplicando los valores óptimos obtenidos en la columna analítica por 35.4. En estas condiciones se recogieron finalmente fracciones de las distintas muestras para su posterior caracterización.

Para comprobar el estado de las columnas cada cierto tiempo se hicieron inyecciones de un patrón de tolueno y acetofenona, compuestos con un tiempo de retención conocido en condiciones estándar.

A la hora de evaluar los resultados obtenidos se procedió siempre de la misma forma. Hay que tener en cuenta que con los detectores utilizados la cantidad de datos disponibles de cada inyección es muy extensa, así que para simplificar la discusión de los resultados tan sólo se muestran aquellos cromatogramas y espectros más representativos en cada caso. La información completa de todas las inyecciones, con sus correspondientes cromatogramas y los espectros de absorción y emisión se encuentran detallados en la parte experimental.

Por una parte, el detector de arreglo de fotodiodos (PDA) realiza un espectro de absorción UV-vis completo a cada tiempo de medida, por lo tanto la información de que se dispone es en 3D, o lo que es lo mismo, hay un cromatograma (intensidad de la absorción frente al tiempo) a cada longitud de onda. A la hora de presentar los datos se seleccionó el cromatograma en el que están presentes y bien definidos todos los picos, tras evaluar todos los datos disponibles, por eso a veces la longitud de onda varía entre unas inyecciones y otras. A continuación se seleccionaron los espectros completos (intensidad de la absorción frente a todas las longitudes de onda medidas) a los tiempos de retención de cada pico. De esta forma se pudieron evaluar los distintos máximos de absorción de cada fracción.

Por otra parte, el detector de fluorescencia o bien realiza un espectro de emisión a una longitud de onda de excitación fija, o bien un espectro de excitación a una longitud de onda de emisión fija. En este caso sólo se realizaron espectros de emisión, fijando consecutivamente varias longitudes de onda de excitación, a fin de contar con los datos suficientes para el análisis de las propiedades fluorescentes de cada fracción en las condiciones de separación óptimas. A la hora de la representación del cromatograma de fluorescencia se hizo lo mismo que con los datos de absorción, se eligió el cromatograma a la longitud de onda que permitió la resolución de todos los picos. Así mismo, finalmente se representaron los espectros de emisión completos de cada fracción, lo que permitió evaluar el máximo de emisión en cada caso. El máximo de excitación se obtuvo por comparación de los espectros de emisión obtenidos en las distintas inyecciones en que la única variable fue la longitud de onda de excitación.

Por último, se asignaron los distintos máximos de emisión a clústeres concretos mediante el modelo del Jellium, como se mostró en el capítulo 1, según la ecuación (7). Aunque hay que tener en cuenta que hasta ahora sólo habíamos tratado máximos de absorción y por tanto se tuvo en cuenta el desplazamiento de Stokes restando 0.5 eV a la energía de la absorción. Ahora todas las muestras cuentan con datos de emisión, por tanto no hace falta hacer esta sustracción. Para cada metal hay que tener en cuenta su valor de E_f : Au 5.3, Ag 5.4 y Cu 7.0 eV.

$$E = E_f / N^{1/3} \quad (7)$$

También hay que tener en cuenta que los dos detectores se encuentran acoplados en serie, de forma que la muestra pasa primero por el PDA y después por el detector de fluorescencia, así que es normal que haya una pequeña diferencia entre los tiempos de retención de una misma fracción en los cromatogramas de absorción y fluorescencia. Por este motivo cuando se indica el tiempo de una fracción con señal en ambos detectores se indica un intervalo de tiempo.

3.2 Clústeres de oro

Se estudió la separación de dos muestras de clústeres de oro, una sintetizada en el laboratorio de investigación por María Rodríguez y otra proporcionada por la empresa Nanogap. En la tabla 14 aparecen resumidas las características de estas muestras.

Tabla 14. Muestras de clústeres de oro proporcionado para su purificación por HPLC. **ATF** agente de transferencia de fase, **TOABr** bromuro de tetraoctilamonio, **TBABr** bromuro de tetrabutilamonio, **THAClO₄** perclorato de tetrahexilamonio.

Muestra	Tipo síntesis, ATF o electrolito soporte	Disolvente
AuCLsH1	electroquímica, NaCl	agua
AuCLsH2	química, THAClO ₄	tolueno

A. *AuCLsH1*

Es muestra fue proporcionada por la empresa Nanogap. Se trata de una mezcla de clústeres sintetizada mediante un método electroquímico, usando únicamente NaCl como electrolito soporte. Sus espectros de absorción y fluorescencia (figura 36) muestran la presencia de clústeres de Au₂ y Au₃, que vienen determinados por los dos máximos de emisión que presenta a 300 y 350 nm cuando se excita a 230 nm.

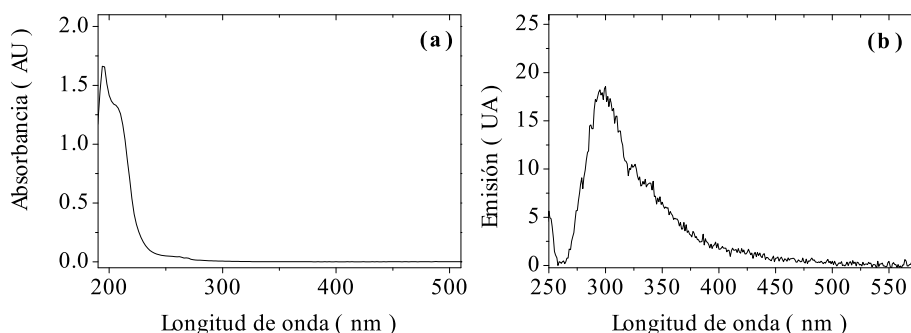


Figura 36. Propiedades ópticas de la muestra inicial AuCLsH1: **(a)** espectro de absorción y **(b)** espectro de emisión excitando a 230 nm.

Esta muestra se separó usando una fase móvil compuesta por una mezcla 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, un volumen de inyección de 2 μl , un flujo de 1 ml/min en una columna analítica de C18. Los cromatogramas en estas condiciones aparecen en la figura 37.

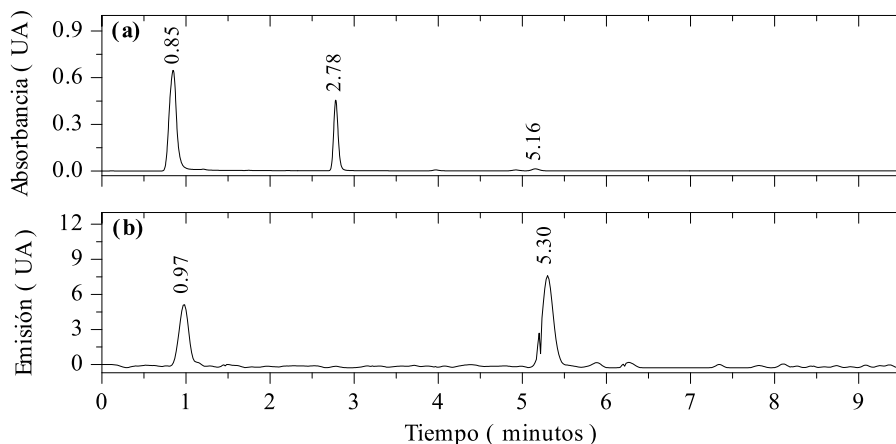


Figura 37. Cromatogramas de la muestra AuCLsH1: **(a)** absorción a 250 nm y **(b)** emisión a 539 nm excitando a 230 nm. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 2 μl , flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

En el cromatograma, registrando la absorción a 250 nm, se observó la elución de tres fracciones a 0.85, 2.78 y 5.16 min. De estas tres fracciones, la primera y la tercera tienen también un pico en el espectro de emisión excitando a 230 nm.

En el espectro de absorción y emisión de estas fracciones (figura 38) se puede ver cómo las propiedades ópticas de las distintas fracciones son distintas (tabla 15) indicando la presencia de tres clústeres distintos, dos de los cuales tienen además propiedades fluorescentes, presentando emisiones distintas al excitar a 230 nm.

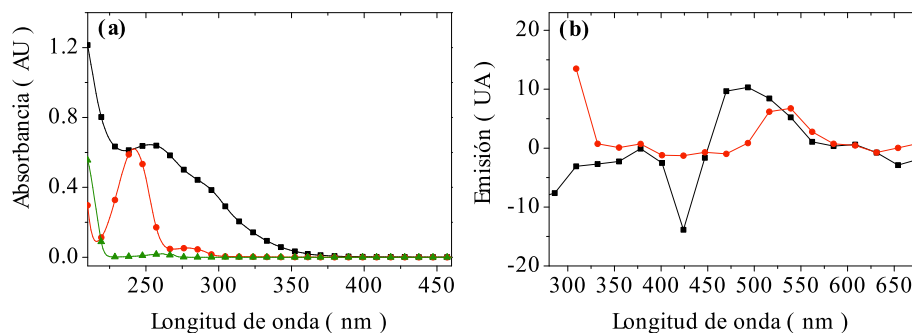


Figura 38. (a) Espectro de absorción a 0.85 (■), 2.78 (●) y 5.16 min de elución (▲). y (b) espectro de emisión excitando a 230 nm a 0.97 (■) y 5.30 min de elución (●). Separación de AuClS1 isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 2 μ l, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

Tabla 15. Máximos de absorción, máximos de excitación y emisión máxima a esta longitud de onda de excitación, de las fracciones que eluyen en la separación de AuClS1.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	0.85-0.97	200, 255, 294	230	491	Au_{10}
2	2.78	200, 241, 282	—	—	Au_3
3	5.16-5.30	200, 263	230	535	Au_{12}

En el caso de las fracciones **1** y **3**, a la hora de calcular el número de átomos por clúster, como presentan fluorescencia, el cálculo es más preciso.

Si se comparan los espectros de emisión de estas fracciones con los de partida se ve cómo existe una clara diferencia. Inicialmente el espectro de emisión presentaba dos máximos a 300 y 350 nm al excitar a 230 nm, correspondientes a clústeres de pequeño tamaño (Au_2 y Au_3). Sin embargo, los

resultados obtenidos en la separación cromatográfica muestran que la mezcla está compuesta de clústeres mayores (Au_{10} y Au_{12}), además del clúster de Au_3 . Esta diferencia entre los máximos de emisión en las muestras inicial y final puede ser debido a la baja concentración de los clústeres. Si se observa más detenidamente, en general los espectros de emisión son poco intensos y puede ser que carezcan de la resolución necesaria, sobre todo en el caso de la muestra inicial, en que se trata de una espectro de la mezcla de dos (o tres) especies distintas.

B. *AuCLsH2*

Esta muestra de clústeres de oro fue sintetizada mediante un método químico en dos fases, similar al visto en el capítulo 2 de esta tesis. Como agente de transferencia de fase se usó perclorato de tetrahexilamonio (THAClO_4). Las propiedades ópticas de la muestra inicial están representadas en la figura 39.

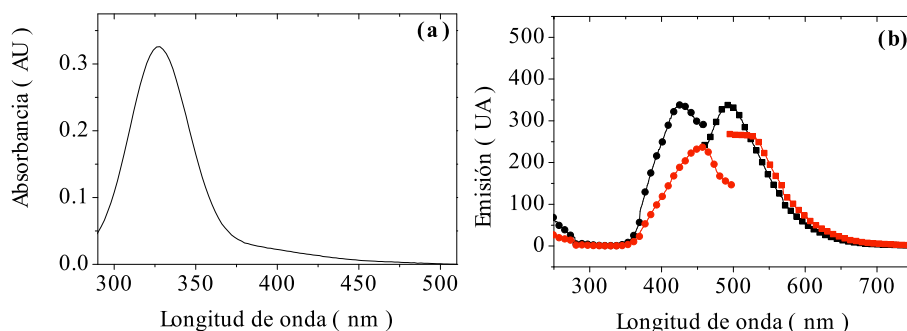


Figura 39. Propiedades ópticas de la muestra inicial de clústeres AuCLsH2 : **(a)** espectro de absorción y **(b)** espectros de emisión a 430 (■) y 460 nm (■) de excitación y espectros de excitación a 490 (●) y 540 nm (●) de emisión.

Según el espectro de fluorescencia la muestra estaría compuesta por dos clústeres de tamaño medio, Au_{10} (emisión a 490 nm) y Au_{12} (emisión 540 nm).

Se separó en unas condiciones parecidas a la muestra anterior, un volumen de inyección de 10 μl , un flujo de 1 ml/min y una fase móvil de 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ en una columna analítica de C18, además se hizo un estudio del cromatograma de emisión al variar la longitud de onda de excitación,

encontrando que la muestra únicamente presentaba fluorescencia al excitar a 270 nm. Los resultados encontrados se ven reflejados en la figura 40.

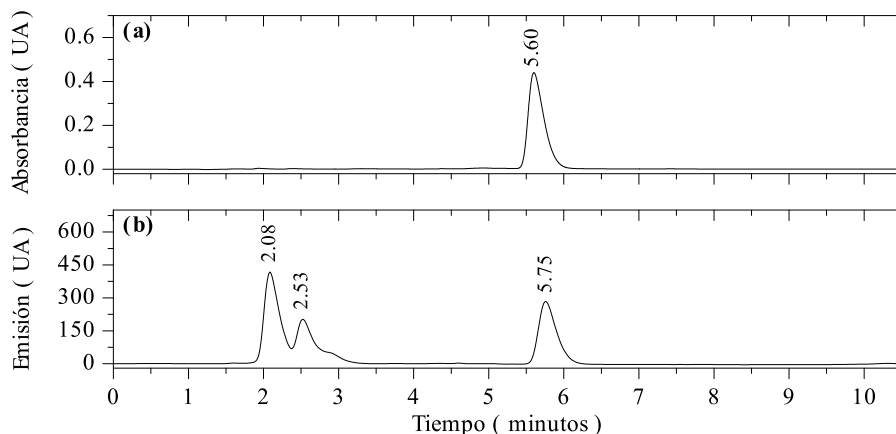


Figura 40. Cromatogramas de la muestra AuClSH₂: **(a)** absorción a 212 nm y **(b)** emisión a 296 nm excitando a 270 nm. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

Mientras que en el cromatograma de absorción se ve un único pico bien definido a 5.60 min, en el cromatograma de emisión se observan además picos a 2.08 y 2.53 min.

En la figura 41 están representados los espectros de absorción y emisión de cada una de las fracciones eluidas. Inicialmente eluyen bastante juntos dos fracciones con un máximo de emisión en torno a los 590-600 nm que corresponde al mismo clúster (Au₁₇). La última fracción eluida, por otra parte, tiene el máximo de emisión a 540 nm correspondiente a un clúster de Au₁₂. El hecho de que las primeras fracciones no se hayan detectado con el detector de absorción puede ser debido a que se encuentran en menor concentración y el detector de absorción, que es menos sensible que el de fluorescencia, no es capaz de detectarlos.

De nuevo existe una diferencia entre los clústeres que se deducen del espectro de emisión de la muestra de partida (Au₁₂ y Au₁₀) y los que se observan mediante la cromatografía (Au₁₇ y Au₁₂), aunque en este caso la diferencia no es tan grande como en el caso anterior y en ambos casos los clústeres se encuentran al menos en el mismo orden de tamaños.

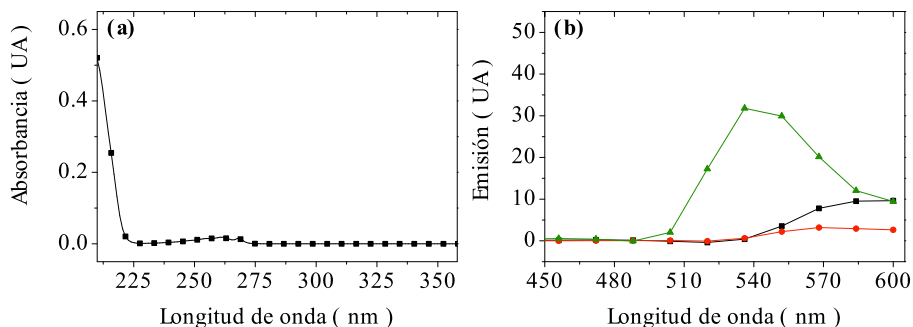


Figura 41. (a) Espectro de absorción a 5.60 min (■) y (b) espectro de emisión excitando a 270 nm a 2.08 (■), 2.53 (●) y 5.75 min (▲). Separación de AuClSH₂ isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μ l, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

Esta muestra además se inyectó en una columna preparativa del mismo relleno (C18). Para mantener las condiciones de la separación al cambiar el tamaño de la columna se empleó el factor de escalado calculado (35.4). Sin embargo, en la práctica resultó un flujo demasiado alto para el equipo (35.4 ml/min), así que finalmente se usó un flujo de 20 ml/min y un volumen de inyección de 200 μ l, manteniendo la fase móvil en un 65:35 CH₃CN:H₂O.

En el cromatograma (figura 42) se aprecia un claro aumento en el tiempo de retención, alcanzando una mayor resolución de los primeras fracciones. Así se obtuvieron mejores espectros de emisión de las distintas fracciones (figura 43).

En la tabla 16 aparecen resumidas las propiedades cromatográficas y ópticas de cada fracción que eluyó en la columna preparativa. Según estos resultados se separaron tres tipos distintos de clústeres: Au₁₂, Au₁₅ y Au₁₇.

El hecho de que el clúster de 12 átomos eluya en dos fracciones se debe probablemente a que en el medio hay clústeres de Au₁₂ con dos entornos distintos, esto es, rodeados por moléculas de disolvente y/o de la sal de THA de forma distinta.

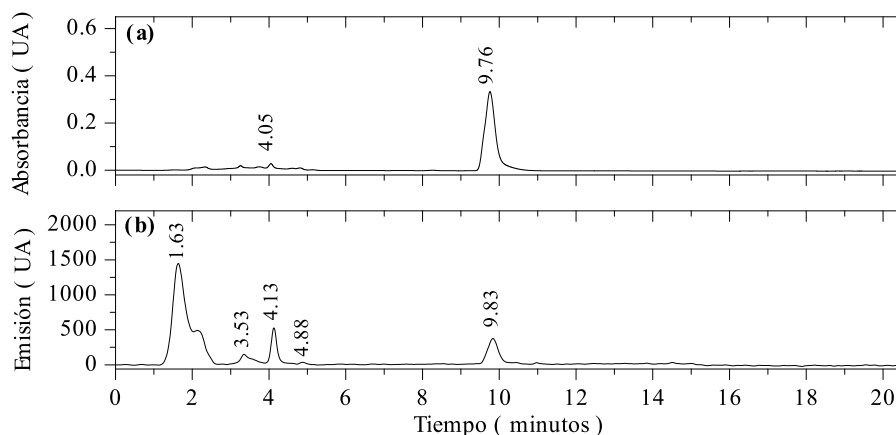


Figura 42. Cromatogramas de la muestra AuCLsH2: **(a)** absorción a 212 nm y **(b)** emisión a 280 nm excitando a 270 nm. Separación isocrática, columna preparativa C18 (volumen inyección 200 μ l, flujo 20 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

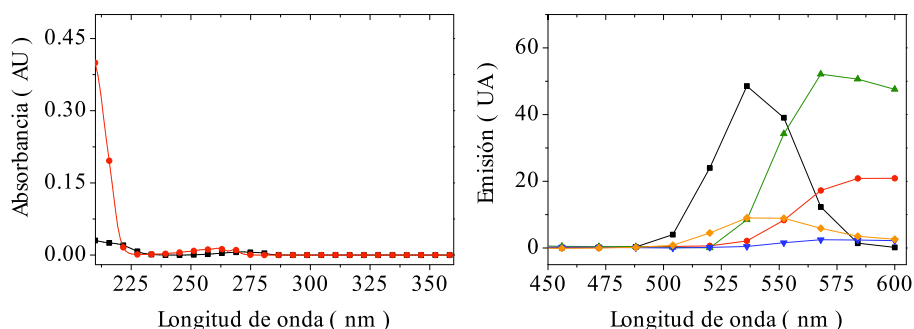


Figura 43. **(a)** Espectro de absorción a 4.05 min (\blacksquare) y 9.76 min (\bullet) y **(b)** espectro de emisión excitando a 270 nm a 1.63 (\blacksquare), 3.35 (\bullet), 4.13 (\blacktriangle), 4.88 (\blacktriangledown) y 9.83 min (\blacklozenge). Separación de AuCLsH2 isocrática, columna preparativa C18 (volumen inyección 200 μ l, flujo 20 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

Con la mayor resolución que proporcionó la columna preparativa la calidad de los espectros de emisión mejoró bastante, de esta forma se comprobó que la mezcla era más compleja de lo que inicialmente se creía, ya que estaba formada por clústeres de tres tipos, todos ellos de un tamaño intermedio (entre 12 y 15 átomos de oro).

Se intentó medir la fluorescencia de las fracciones eluidas y separadas, sin embargo, las fracciones resultaron no tener una intensidad suficiente como para poder medir su fluorescencia una vez fuera del detector del HPLC. Para poder estudiar mejor cada fracción sería necesario realizar inyecciones sucesivas, juntando así más cantidad de muestra.

Tabla 16. Máximos de absorción, máximos de excitación y emisión máxima a esta longitud de onda de excitación, de las fracciones que eluyen en la separación en columna preparativa de AuCLsH2.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	1.63	—	270	539	Au ₁₂
2	3.35	—	270	596-600	Au ₁₇
3	4.05-4.13	222, 274	270	575	Au ₁₅
4	4.88	—	270	572	Au ₁₅
5	9.76-9.83	200, 260-268	270	542	Au ₁₂

3.3 Clústeres de plata

Se estudió la separación de dos muestras de clústeres de plata, una sintetizada en el laboratorio de investigación por María Rodríguez y otra proporcionada por la empresa Nanogap. En la tabla 17 aparecen reflejadas las condiciones de síntesis y las características de las distintas muestras.

Tabla 17. Muestras de clústeres de plata proporcionadas para su purificación por HPLC. ATF agente de transferencia de fase.

Muestra	Síntesis, ATF o electrolito soporte	Disolvente
AgCLsH1	irradiación UV, glutatión	agua
AgCLsH2	electroquímica, NaCl	agua

A. AgCLsH1

La muestra AgCLsH1 se sintetizó por un método de irradiación UV en medio orgánico y extraída posteriormente a agua con glutatión. Sus propiedades ópticas están representadas en la figura 44. En el espectro de absorción presenta un máximo de emisión a 300 nm, con varios hombros a 310, 350 y 460 nm. Haciendo el cálculo mediante el modelo del Jellium estos máximos corresponderían a clústeres de Ag₃, Ag₄, Ag₆ y Ag₁₅. Sin embargo, al realizar el cálculo con el máximo de emisión observado para esta muestra éste corresponde a un clúster de Ag₁₁.

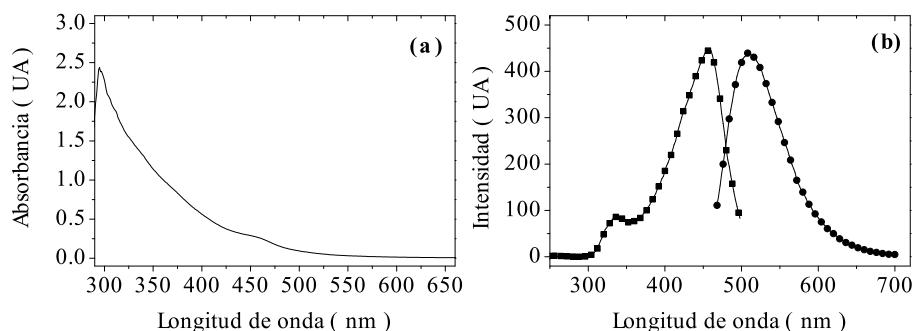


Figura 44. Propiedades ópticas de la muestra inicial de clústeres AgCLsH1: **(a)** espectro de absorción y **(b)** espectros de excitación a 508 nm de emisión (■) y espectro de emisión a 458 nm de excitación (●).

Se llevó a cabo un estudio de la fase móvil más adecuada para su purificación, probando distintas mezclas de metanol y acetonitrilo en agua. Aunque no se se muestran los resultados, la variación en la separación no fue importante. Además se probó a añadir ácido fórmico para evaluar el efecto del pH en la elución de las distintas fracciones de la muestra. No se observó ningún efecto, ni positivo ni negativo.

Finalmente se optó por unas condiciones de inyección de 20 µl de volumen de inyección, un flujo de 0.8 ml/min y una fase móvil de 90:10 CH₃CN:H₂O, en una columna analítica de C18. En estas condiciones se hizo un estudio del cromatograma a distintas excitaciones y la mayor intensidad de emisión se encontró excitando a 340 nm. En la figura 45 aparecen los cromatogramas de absorción y emisión en estas condiciones.

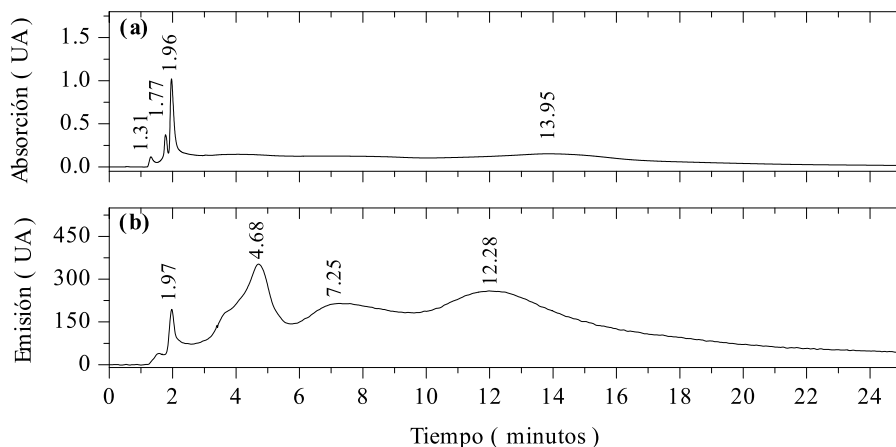


Figura 45. Cromatogramas de la muestra AgCLsH1: **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 410 nm excitando a 340 nm. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 20 μ l, flujo 0.8 ml/min y eluyente 90:10 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

En la tabla 18 aparecen resumidas las propiedades ópticas de cada fracción, mientras que en las figuras 46 y 47 aparecen representados los espectros de absorción y emisión de los picos más relevantes.

En general la separación no es eficiente, por una parte las fracciones eluyen bastante juntas y no se resuelven, sobre todo al final de la cromatografía. Por otra parte, observando los espectros de absorción y emisión se ven mezclas de clústeres de menor tamaño que el esperado según los espectros de absorción y fluorescencia de la muestra inicial, como por ejemplo en las fracciones **3**, **6** y **7** en que el clúster mayoritario es Ag_6 pero también presenta una emisión indicativa del clúster Ag_7 .

Con el fin de mejorar la separación de los clústeres se probó una elución en gradiente. Los gradientes utilizados fueron mezclas de acetonitrilo y agua (figura 48). Se probaron cuatro gradientes distintos, dos partiendo de una mezcla de acetonitrilo agua y luego aumentando hasta un 99% la proporción de acetonitrilo y otros dos en que partiendo de un 100% de acetonitrilo se fue aumentando la cantidad de agua progresivamente.

Las separaciones variaron notablemente con las distintas condiciones y esto se puede ver en la figura 49.

Tabla 18. Máximos de absorción, máximos de excitación y emisión máxima a esta longitud de onda de excitación, de las fracciones que eluyen en la separación en columna analítica, elución isocrática de AgCLsH1.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	1.31	200, 224	—	—	—
2	1.77	200, 256	—	—	Ag ₂
3	1.95-1.97	200, 217	340	412	Ag ₆
4	3.17	—	370	435	Ag ₇
5	4.40-4.68	—	340	415	Ag ₆
6	6.43-7.25	—	340	407	Ag ₆
7	10.78-12.28	—	340	398	Ag ₅
			390	462	Ag ₈
8	10.38-13.95	215, 285	370	411	Ag ₆

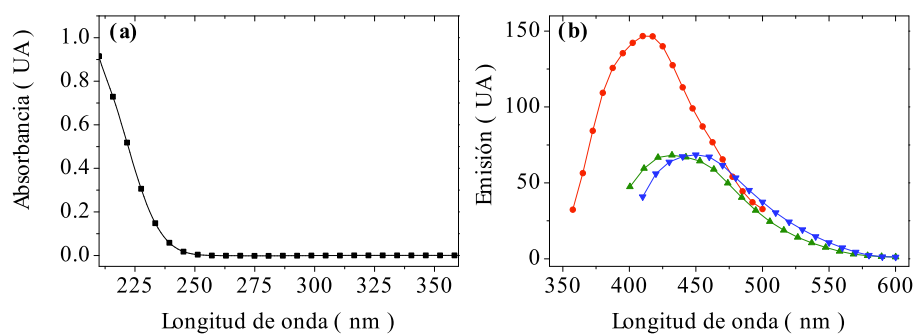


Figura 46. (a) Espectro de absorción a 1.95 min (■) y (b) espectro de emisión a 1.97 min excitando a 340 (●), 370 (▲) y 390 nm (▼). Facción 3 de la separación de AgCLsH1 isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 20 µl, flujo 0.8 ml/min y eluyente 90:10 CH₃CN:H₂O).

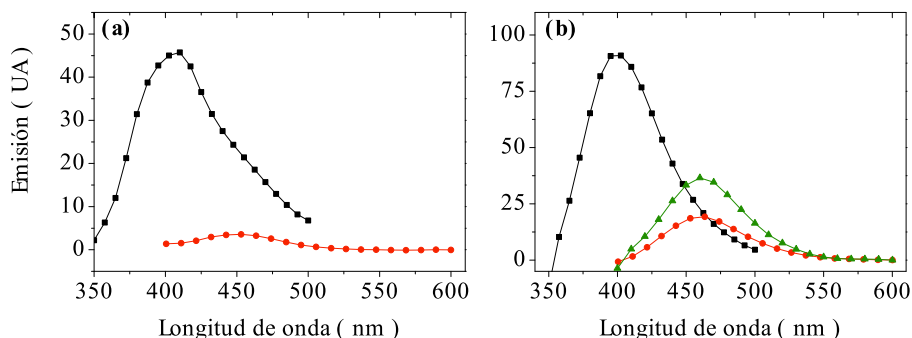


Figura 47. (a) Espectro de emisión a 7.25 min y (b) espectro de emisión a 12.28 min. En ambos casos excitando a 340 (■), 370 (●) y 390 nm (▲). Fracciones 6 y 7 de la separación de AgCLsH1 isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 20 μ l, flujo 0.8 ml/min y eluyente 90:10 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

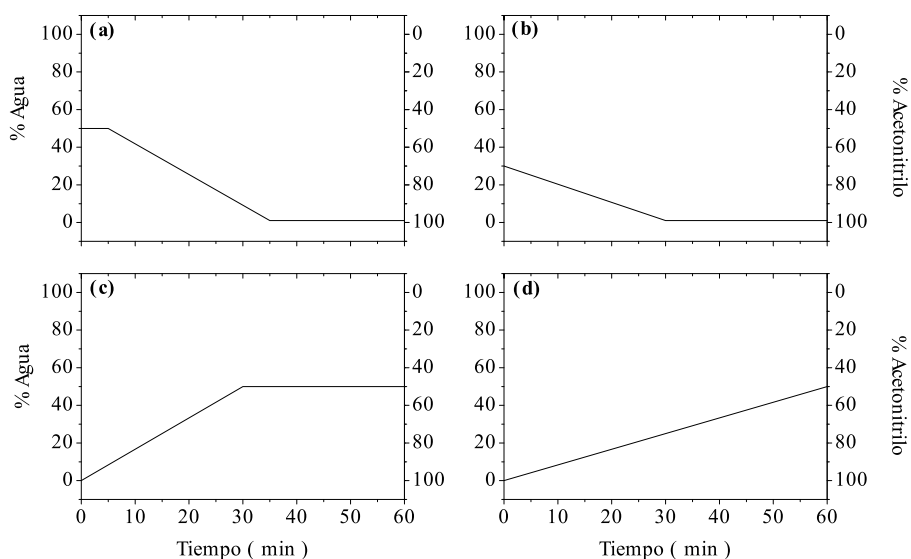


Figura 48. Gradientes usados en la separación de la muestra AgCLsH1 representados en función de los porcentajes de agua y acetonitrilo.

En los gradientes en que se partió de una mezcla de los dos disolventes tan solo se observó la elución de una fracción, por lo que todos los clústeres eluyen juntos. Los clústeres se encuentran inicialmente en agua, el hecho de añadir una cantidad grande de este disolvente desde el principio provocó que eluyeran en los primeros momentos de la separación.

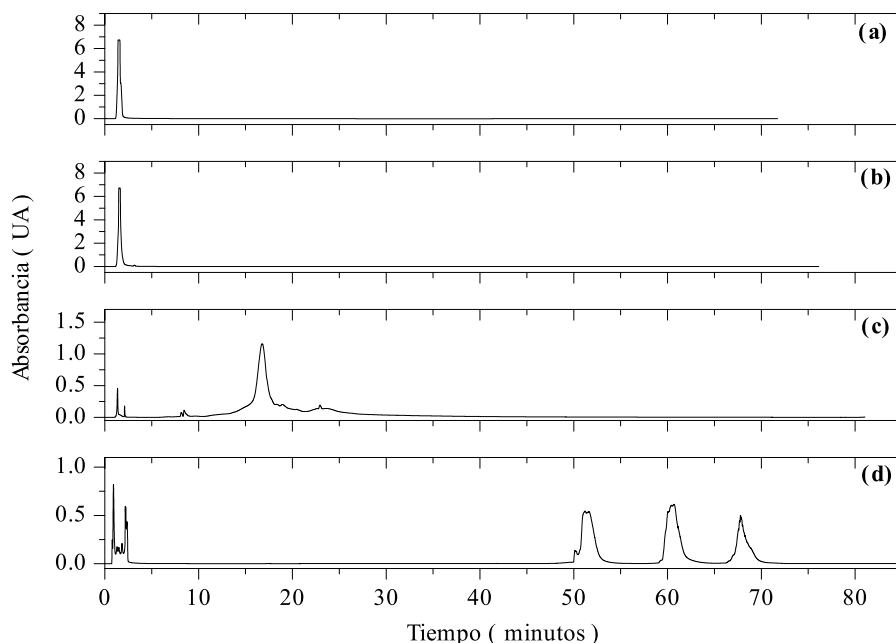


Figura 49. Comparativa de la separación de AgClS1H1 con distintos gradientes: **(a)**, **(b)**, **(c)** y **(d)** se corresponden con la figura 48, en todos los casos cromatogramas de absorción a 220 nm. Separación en gradiente, columna analítica C18 (volumen inyección 20 μ l, flujo 0.8 ml/min).

Así los mejores gradientes resultaron ser aquellos en que inicialmente se parte de un 100% de acetonitrilo y se va aumentando progresivamente la cantidad de agua (figura 48 **(c)** y **(d)**). Las composiciones inicial y final del eluyente son las mismas en ambos casos y cuanto más lento es el gradiente más aumenta el tiempo de la cromatografía, hasta hacerse demasiado largo, como en el caso del gradiente **(d)** (figura 49) en que el último pico eluye tras 70 minutos de separación. En las condiciones del gradiente **(c)** (figura 49) se hizo un estudio más detallado de la fluorescencia, haciendo varias inyecciones variando la longitud de onda de excitación. En la figura 50 se pueden ver los cromatogramas de absorción y emisión con una excitación de 340 nm (excitación a la que el cromatograma es más intenso).

En la tabla 19 están resumidas las propiedades ópticas de las nueve fracciones eluidas. Pese al gradiente no se consiguieron resolver mejor las fracciones. Si bien en esta ocasión sólo apareció una fracción con mezcla de clústeres Ag₆ y Ag₇ a los 17 minutos (fracción **6**). En las figuras 51 y 52 se pueden ver los

espectros de absorción y emisión de algunos de los picos más representativos de la separación.

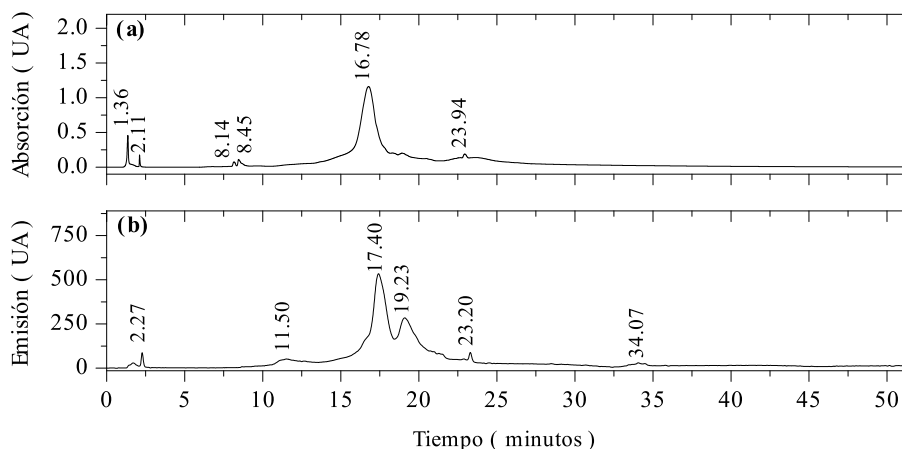


Figura 50. Cromatogramas de la muestra AgCLsH1: **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 420 nm excitando a 340 nm. Separación en gradiente, columna analítica C18 (volumen inyección 20 μ l, flujo 0.8 ml/min y eluyente en gradiente en 30 min de 100:0 a 50:50 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

Tabla 19. Máximos de absorción, máximos de excitación y emisión máxima a esta longitud de onda de excitación, de las fracciones que eluyen en la separación en columna analítica, elución en gradiente de AgCLsH1.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	1.36-1.87	210, 216	390	430	Ag_7
2	2.11-2.27	210, 256	340	384	Ag_5
3	8.14	210, 271, 289	—	—	Ag_3, Ag_2
4	8.45	210	—	—	—
5	11.50-12.82	—	340	431	Ag_7
6	16.48-17.40	210, 212	370	422	Ag_6
7	18.78-19.05	—	340	442	Ag_7
8	23.08-23.94	210, 253, 292	340	432	Ag_7
9	34.07	—	340	420	Ag_6

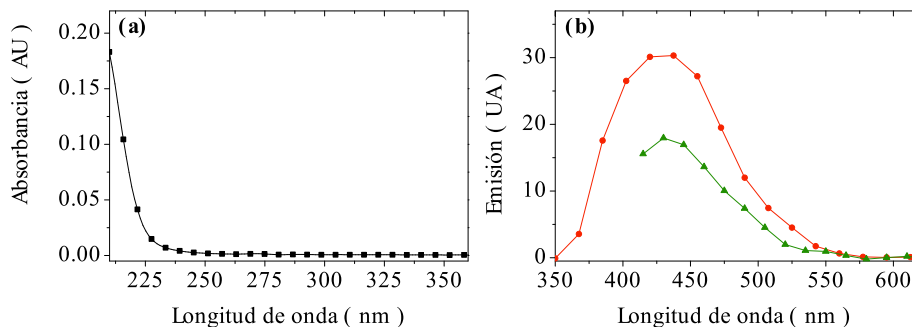


Figura 51. (a) Espectro de absorción a 8.14 min (■) y (b) espectro de emisión a 12.82 min excitando a 340 (●) y 390 nm (▲). Fracciones **3** y **5** de la separación de AgCLsH1 en gradiente, columna analítica C18 (volumen inyección 20 μ l, flujo 0.8 ml/min y eluyente en gradiente en 30 min de 100:0 a 50:50 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

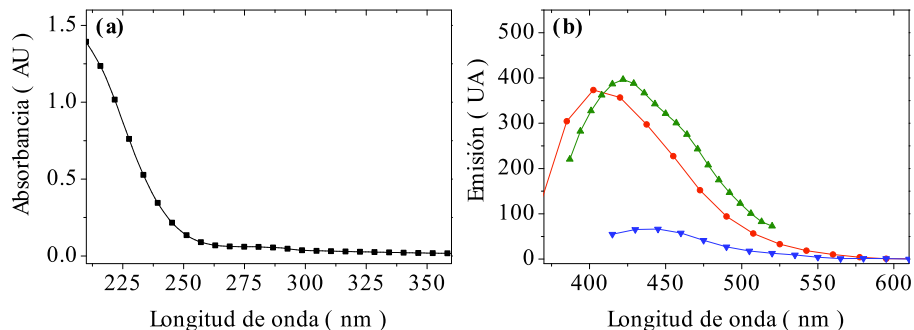


Figura 52. (a) Espectro de absorción a 16.48 min (■) y (b) espectro de emisión a 17.40 min excitando a 340 (●), 370 (▲) y 390 nm (▼). Fracción **6** de la separación de AgCLsH1 en gradiente, columna analítica C18 (volumen inyección 20 μ l, flujo 0.8 ml/min y eluyente en gradiente en 30 min de 100:0 a 50:50 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

Al igual que en la elución isocrática, los clústeres observados son más pequeños que los presentes en la muestra inicial. Como ya se ha comentado en el capítulo 1 de esta tesis, existe una tendencia en los clústeres de agruparse de forma reversible cuando se encuentran con cargas opuestas. De esta forma es posible que en la muestra inicial los clústeres más pequeños se encuentren asociados formando clústeres de mayor tamaño y que al introducir la mezcla en la columna se separen, dando lugar a la elución de clústeres de menor tamaño.

De la misma forma que ocurrió con la muestra de clústeres de oro AuCLsH2, con esta muestra de clústeres de plata, se observó la elución del mismo clúster en fracciones distintas. Al igual que antes esto es indicativo de la presencia de clústeres del mismo tamaño con distintos entornos, o lo que es lo mismo, rodeados de distintas moléculas (bien de disolvente o de glutatión).

B. AgCLsH2

Es muestra fue proporcionada por la empresa Nanogap. Se trata de una mezcla de clústeres sintetizada mediante un método electroquímico, usando únicamente NaCl como electrolito soporte, de manera similar a la muestra AuCLsH1. Sus propiedades ópticas están representadas en la figura 53.

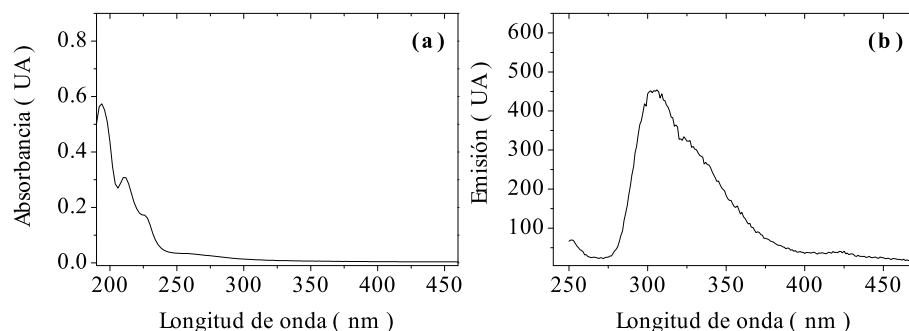


Figura 53. Propiedades ópticas de la muestra inicial AuCLsH1: **(a)** espectro de absorción y **(b)** espectro de emisión excitando a 230 nm.

El espectro de absorción presenta bandas a 192, 209 y 227 nm, correspondientes a clústeres de pequeño tamaño, estas longitudes de onda son tan pequeñas que no se pudieron asignar a clústeres mediante el método del Jellium. Sin embargo, el espectro de emisión si permitió esta asignación, la muestra presenta un máximo de emisión a 300 nm, correspondiente a un clúster de Ag_2 , un hombro a 350 nm, correspondiente a Ag_3 y finalmente un pico de mucha menos intensidad a 424 nm que correspondería a un clúster de Ag_6 .

Para la optimización de las condiciones de separación de esta muestra se probaron mezclas de distintas proporciones de acetonitrilo y metanol en agua, usando la columna de C18: 70:30, 65:35, 50:50 y 40:60 de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$;

70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 45:55 y 40:60 MeOH:H₂O, en las figuras 54 y 55 se puede ver una comparativa de las condiciones más representativas en cada caso.

En general, las separaciones resultaron parecidas en ambas mezclas de disolventes. Se observaron cuatro fracciones, la primera no cambió su tiempo de retención al ir variando el eluyente, en el caso de las mezclas de acetonitrilo, sin embargo, las otras fracciones si se desplazan a tiempos mayores al aumentar la cantidad de agua en la mezcla. Esta tendencia se observó también en el caso de las mezclas de metanol.

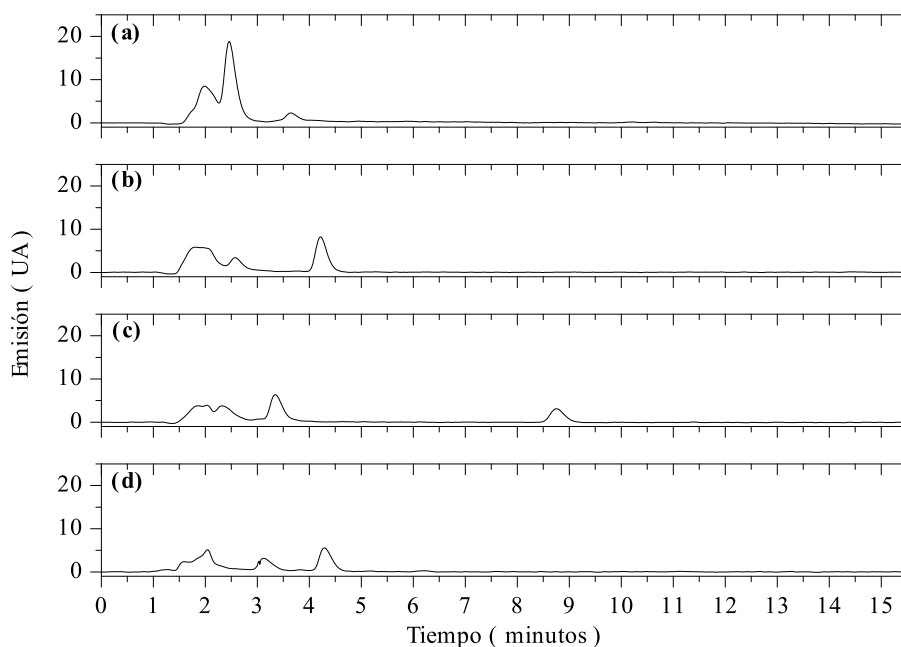


Figura 54. Comparativa de la separación de $\text{AgCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con distintas mezclas de CH_3CN y H_2O como eluyente: **(a)** 70:30 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, **(b)** 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, **(c)** 50:50 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ y **(d)** 40:60 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$. Cromatogramas de emisión a 294, 328, 313 y 311 nm excitando a 250 nm, respectivamente. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μl , flujo 1 ml/min).

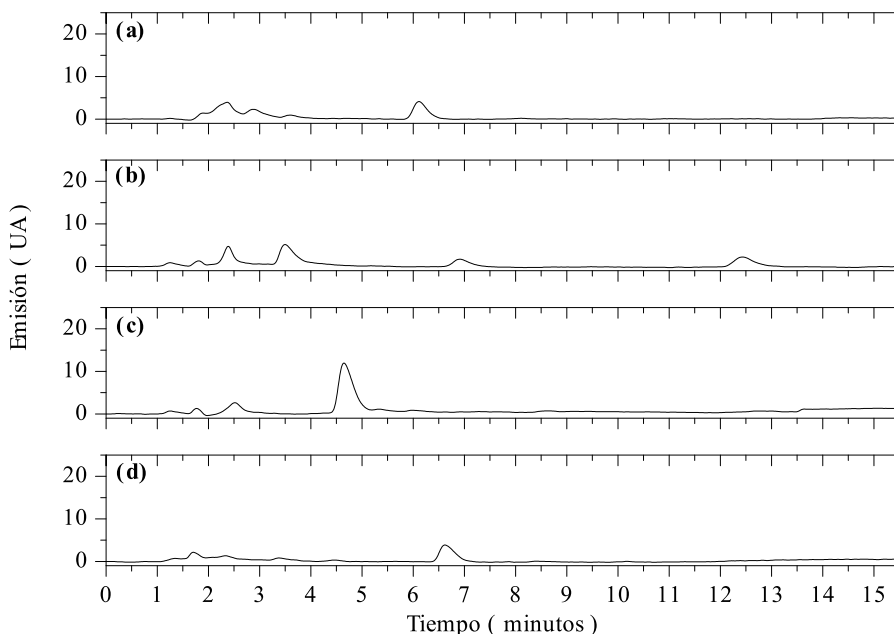


Figura 55. Comparativa de la separación de AgCLsH₂ con distintas mezclas de MeOH y H₂O como eluyente: **(a)** 70:30 MeOH:H₂O, **(b)** 60:40 MeOH:H₂O, **(c)** 50:50 MeOH:H₂O y **(d)** 40:60 MeOH:H₂O. Cromatogramas de emisión a 328, 311, 294 y 311 nm excitando a 250 nm respectivamente. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/min).

Además se probó una columna con un relleno amino, con distintas mezclas de acetonitrilo y metanol en agua como eluyentes: 70:30, 65:35, 50:50 y 40:60 CH₃CN:H₂O y 90:10, 80:20 y 70:30 MeOH:H₂O.

Como se puede ver en las figuras 56 y 57, las separaciones en esta columna fueron peores que en la columna de C18 ya que sólo se observó un pico muy ancho, así que se descartó el uso de este nuevo relleno.

Aunque la resolución alcanzada no fue muy buena en ningún caso, se eligió la mezcla 65:35 CH₃CN:H₂O en la columna de C18 como la más interesante para estudiar con más detalle las propiedades de fluorescencia, haciendo barridos de emisión para excitaciones de 230 a 410 nm, de 20 en 20 nm. En la figura 58 aparecen representados el cromatograma de absorción y emisión

excitando a 270 nm, longitud de onda a la que se observó la mayor intensidad de emisión.

En la tabla 20 aparecen reflejadas las propiedades ópticas de las distintas fracciones eluidas en estas condiciones. Mayoritariamente la muestra está compuesta por clústeres pequeños, tal y como se vio en la muestra inicial. Aunque al separar la muestra en distintas fracciones se pudo resolver además un clúster de Ag_5 .

De nuevo se observó la tendencia de un mismo clúster a eluir a tiempos distintos. En las figuras 59 y 60 se pueden ver los espectros de absorción y emisión de varios picos eluidos en la separación de la muestra.

Al igual que ocurrió con la otra muestra de clústeres de plata, alguna de las fracciones estaba compuesta por mezclas de distintos tamaños como en el caso de la **3**, con un tiempo de retención de 2.06 minutos.

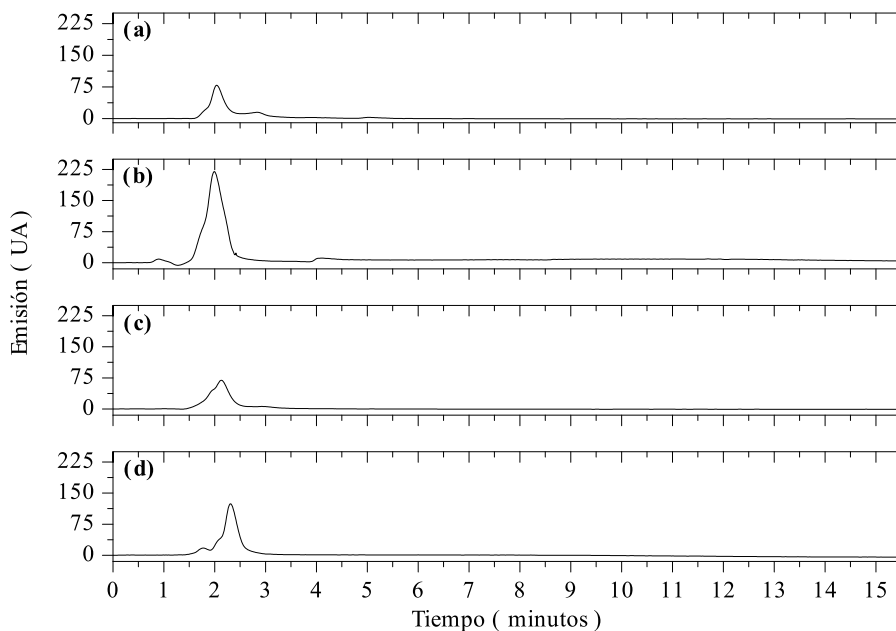


Figura 56. Comparativa de la separación de AgClSH_2 con distintas mezclas de CH_3CN y H_2O como eluyente: **(a)** 70:30 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, **(b)** 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, **(c)** 50:50 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ y **(d)** 40:60 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$. Cromatogramas de emisión a 315, 294, 311 y 294 nm excitando a 250 nm respectivamente. Separación isocrática, columna analítica NH_2 (volumen inyección 10 μl , flujo 1 ml/min).

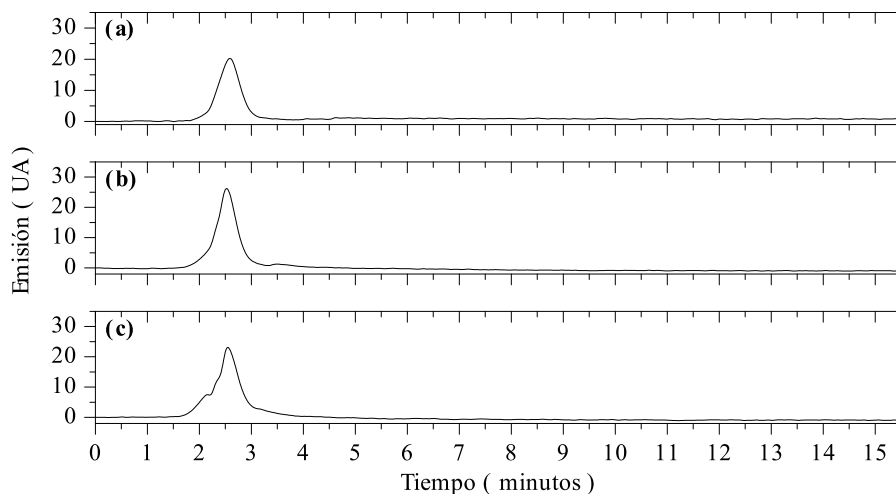


Figura 57. Comparativa de la separación de AgCLsH_2 con distintas mezclas de MeOH y H_2O como eluyente: **(a)** 90:10 MeOH: H_2O , **(b)** 80:20 MeOH: H_2O y **(c)** 70:30 MeOH: H_2O . Cromatogramas de emisión a 311, 294 y 294 nm excitando a 250 nm, respectivamente. Separación isocrática, columna analítica NH_2 (volumen inyección 10 μl , flujo 1 ml/min).

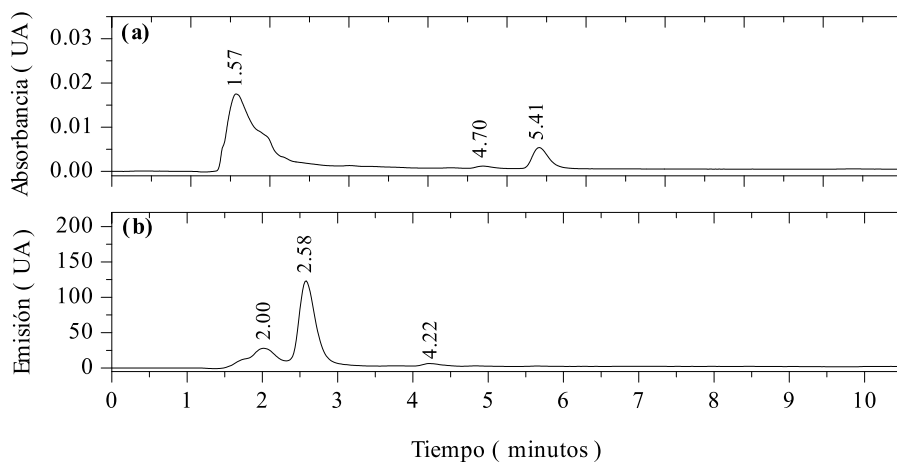


Figura 58. Cromatogramas de la muestra AuCLsH_2 : **(a)** absorción a 230 nm y **(b)** emisión a 305 nm excitando a 270 nm de la muestra AgCLsH_2 . Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μl , flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

Tabla 20. Máximos de absorción, máximos de excitación y emisión máxima a esta longitud de onda de excitación, de las fracciones que eluyen en la separación en columna analítica, elución isocrática de AgCLsH2.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	1.57-1.67	270	350	415	Ag ₆
2	1.78	—	300	387	Ag ₅
3	2.00-2.10	—	350	416	Ag ₆
4	2.58	—	230	277	Ag ₂
5	3.72	—	300	340	Ag ₃
6	4.22-4.30	—	230	323	Ag ₅
7	4.7	210, 244	—	—	Ag ₂
8	5.41	210, 252	—	—	Ag ₂

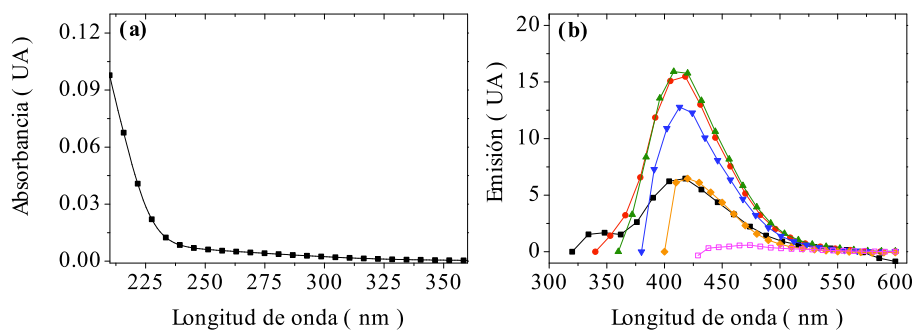


Figura 59 (a) Espectro de absorción a 1.57 min (■) y (b) espectro de emisión a 1.67 min excitando a 310 (■), 330 (●), 350 (▲), 370 (▼), 390 (◆) y 410 nm (◻). Fracción 1 de la separación de AgCLsH2 isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

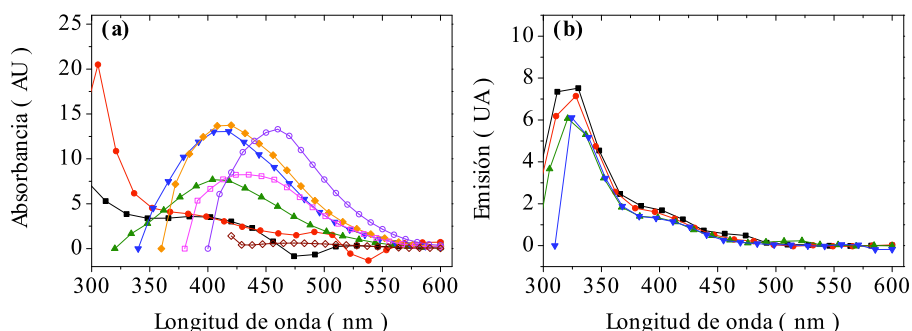


Figura 60. (a) Espectro de emisión a 2.10 min excitando a 230 (■), 270 (●), 310 (▲), 330 (▼), 350 (◆), 370 (◻), 390 (◊) y 410 nm (◊) y (b) espectro de emisión a 4.30 min excitando a 230 (■), 250 (●), 270 (▲) y 300 nm (▼). Fracciones **3** y **6** de la separación de AgClSH₂ isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μ l, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

Esta muestra también se inyectó en la columna preparativa en las mejores condiciones encontradas para la columna analítica, que fueron una fase móvil de 65:35 CH₃CN:H₂O. Los cromatogramas de absorción y emisión están representados en la figura 61.

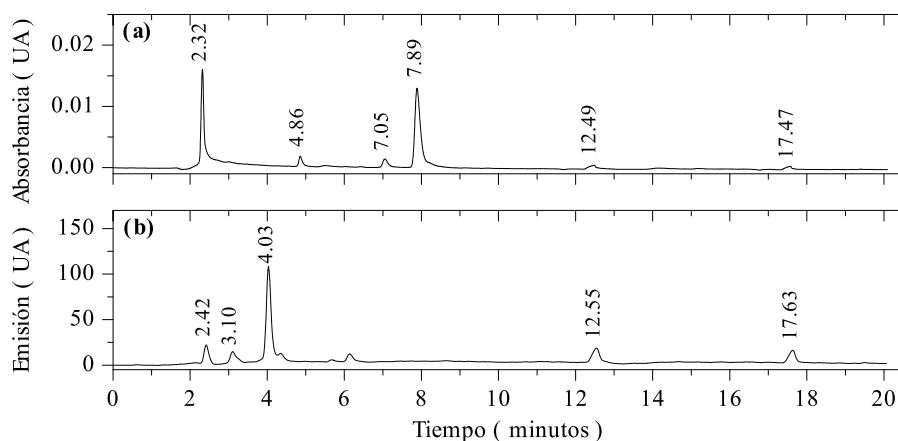


Figura 61. Cromatogramas de la muestra AgClSH₂: (a) absorción a 239 nm y (b) emisión a 312 nm excitando a 250 nm. Separación isocrática, columna preparativa C18 (volumen inyección 200 μ l, flujo 20 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

Al llevar a cabo el escalado la resolución de la cromatografía aumentó notablemente, las fracciones de mayor intensidad fueron las mismas y en estas

condiciones de mayor cantidad de muestra, se consiguieron resolver fracciones intermedias de menor intensidad, llegando a comprobar como en algunas fracciones los espectros de emisión resultaron ser combinación de varios clústeres y no clústeres puros. En la tabla 21 se encuentran resumidas las propiedades ópticas de las fracciones separadas.

Tabla 21. Máximos de absorción y emisión máxima excitando a 250 nm, de las fracciones que eluyen en la separación en columna preparativa, elución isocrática de AgClSH₂.

Pico	TR/min	Abs./nm	Em./nm	Clústeres
1	2.32-2.42	210, 279	410, 561	Ag ₄ , Ag ₆
2	3.10	—	295, 503	Ag ₂ , Ag ₁₀
3	4.03	—	295, 550-600	Ag ₂ , Ag ₁₈
4	7.05	210, 241	—	Ag ₂
5	7.89	210, 247	—	Ag ₂
6	12.49-12.55	210	520	Ag ₁₂
7	17.57-17.63	210	520	Ag ₁₂

Resulta curioso que el clúster Ag₃ ya no se encuentra presente en ninguna fracción de la cromatografía, por lo que debe de haberse agregado para dar lugar a clústeres de mayor tamaño, como Ag₁₀ y Ag₁₈, que aparecen ahora mezclados con los clústeres pequeños en las primeras fracciones y el clúster Ag₁₂, que eluye en último lugar y solo.

3.4 Clústeres de cobre

Las dos muestras purificadas por HPLC de cobre fueron sintetizadas en nuestro laboratorio de investigación por Noelia Vilar dentro de su tesis doctoral,⁹¹ las condiciones de síntesis de las distintas muestras están en la tabla 22.

Tabla 22. Muestras de clústeres de cobre proporcionadas para su purificación por HPLC. **TBAAC** acetato de tetrabutilamonio.

Muestra	Síntesis, electrolito soporte	Disolvente
CuCLsH1	electroquímica, TBAAC	acetonitrilo
CuCLsH2	electroquímica, TBANO ₃	acetonitrilo

A. CuCLsH1

La muestra CuCLsH1 fue sintetizada mediante un método electroquímico usando TBAAC en acetonitrilo como electrolito soporte.¹⁹ Como se puede ver en la figura 62, el espectro de absorción de la muestra presenta máximos a 212 y 270 nm, indicativos de clústeres de Cu₂ y Cu₅, mientras que el espectro de emisión presenta emisiones que corresponden a clústeres de mayor tamaño: Cu₈ (360 nm), Cu₁₂ (400 nm) y Cu₂₄ (520 nm).

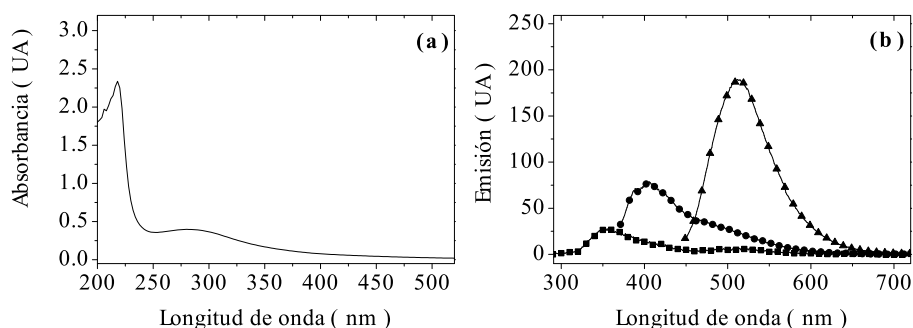


Figura 62. Propiedades ópticas de la muestra inicial CuCLsH1: **(a)** espectro de absorción y **(b)** espectros de emisión excitando a 230 nm (■), 350 nm (●) y 430 nm (▲).

Para esta muestra se probaron mezclas de acetonitrilo y metanol en agua como eluyente, en distintas proporciones, usando la columna de C18: 90:10, 70:30, 65:35 y 45:55 CH₃CN:H₂O y 90:10, 80:20, 50:50 y 40:60 MeOH:H₂O (figuras 63 y 64).

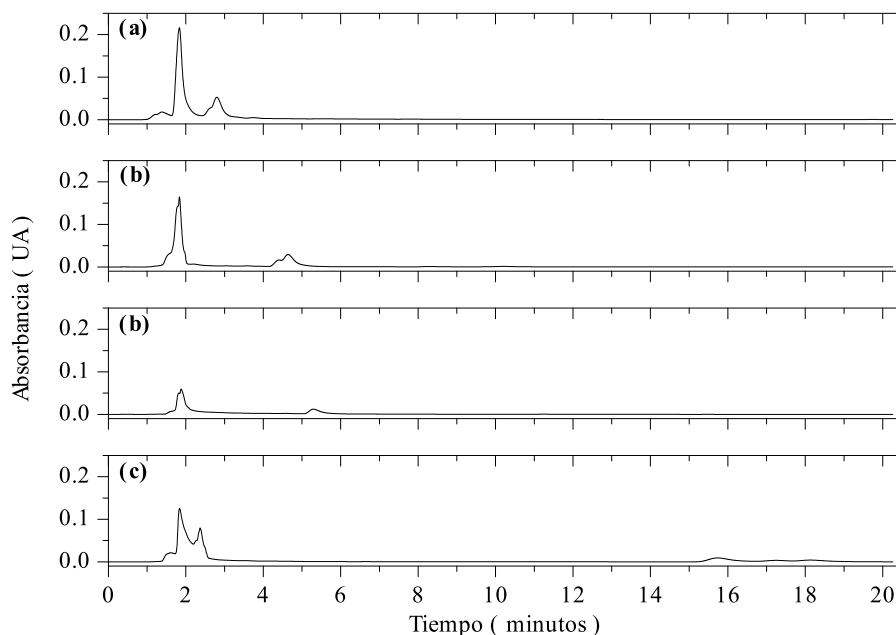


Figura 63. Comparativa de la separación de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con distintas mezclas de CH_3CN y H_2O como eluyente: **(a)** 90:10 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, **(b)** 70:30 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, **(c)** 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ y **(d)** 45:55 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$. Cromatogramas de absorción a 215, 216, 240 y 216 nm respectivamente. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μl , flujo 1 ml/minuto).

Para las mezclas con acetonitrilo, al aumentar la proporción de agua de un 10% a un 30% se resolvieron las fracciones iniciales. Esta tendencia sigue al ir aumentando la cantidad de agua progresivamente hasta un 55%, en que esta tendencia se revierte.

La separación mejoró al usar metanol en vez de acetonitrilo, también se observó la elución de tres fracciones, que se separan al aumentar la proporción de agua de un 10% a un 20%. La mejor separación resultó ser con una proporción de 80:20 $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, a partir de ahí la separación volvió a empeorar.

En las condiciones óptimas, 80:20 $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, se estudió detalladamente la fluorescencia de las distintas fracciones, haciendo inyecciones sucesivas variando la longitud de onda de excitación entre 230 y 370 nm. En la figura 65 aparecen representados los cromatogramas de absorción y emisión

excitando a 290 nm, longitud de onda a la que la intensidad es mayor y a 250 nm. A esta longitud de onda aunque la intensidad no es tan elevada presenta más picos que la anterior.

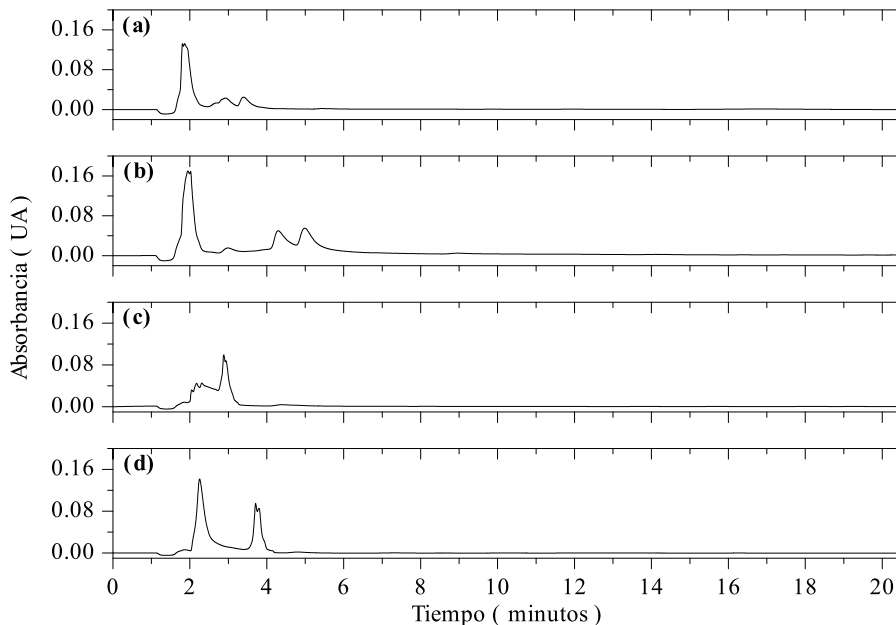


Figura 64. Comparativa de la separación de CuCLsH1 con distintas mezclas de MeOH y H₂O como eluyente: **(a)** 90:10 MeOH:H₂O, **(b)** 80:20 MeOH:H₂O, **(c)** 50:50 MeOH:H₂O y **(d)** 40:60 MeOH:H₂O. Cromatogramas de absorción a 216, 212, 216 y 216 nm respectivamente. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/minuto).

En total eluyeron nueve fracciones distintas con distintas propiedades espectroscópicas (tabla 23). En las figuras 66 y 67 están representados a modo de ejemplo los espectros de absorción y emisión de aquellas fracciones más intensas como es el caso de la fracción **2** (2.07 min) que correspondería a un clúster de Cu₁₁, la fracción **8** (4.52 min) correspondiente a un clúster de Cu₂₈ y la fracción **9** (10.15 min) correspondiente a un clúster de Cu₄.

Al igual que ocurrió con los clústeres de oro y plata, la muestra resultó más compleja de lo esperado a la vista de los espectros de absorción y emisión de la muestra inicial. Al llevar a cabo la separación se pudieron identificar más clústeres, de tamaño pequeño (Cu₄, Cu₅, Cu₆ y Cu₈), de tamaño medio (Cu₁₁ y Cu₁₃) y de tamaño grande (Cu₂₈). Se sigue observando la elución de un

mismo clúster a distintos tiempos de retención indicativo de una distinta esfera de coordinación para un mismo clúster.

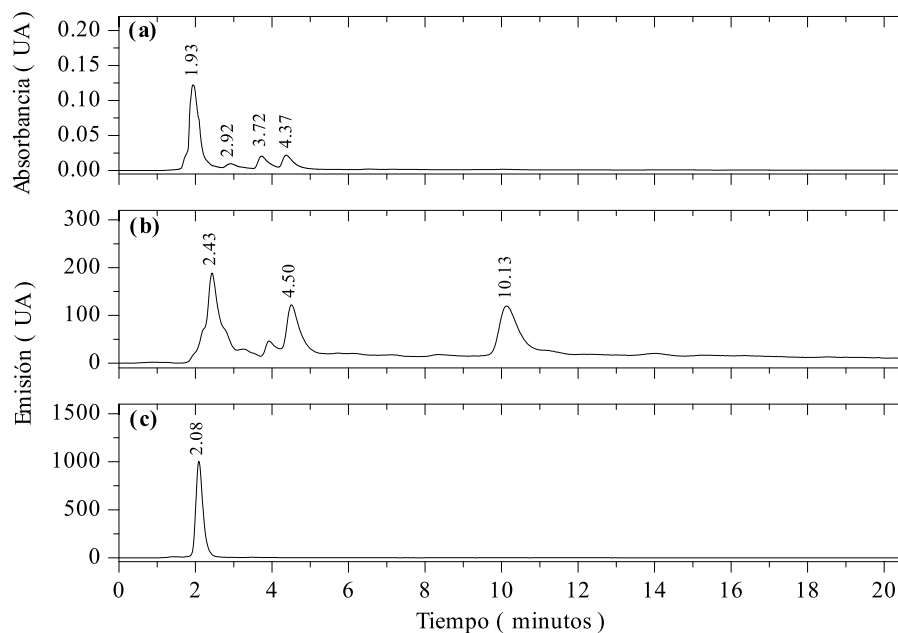


Figura 65. Cromatogramas de la muestra CuCl₅H1 **(a)** absorción a 216 nm, **(b)** emisión a 294 excitando a 250 nm y **(c)** emisión a 390 excitando a 290 nm. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μ l, flujo 1 ml/min y eluyente 80:20 MeOH:H₂O).

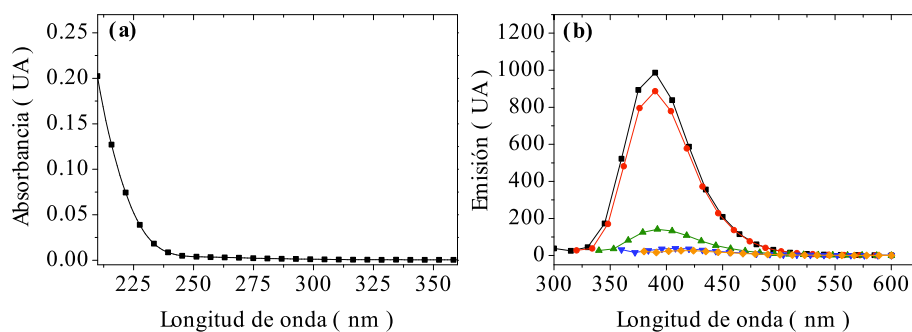


Figura 66. **(a)** Espectro de absorción a 2.07 min y **(b)** espectro de emisión a 2.07 min excitando a 290 (■), 310 (●), 330 (▲), 350 (▼) y 370 nm (◆). Pico 2 de la separación de CuCl₅H1 isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μ l, flujo 1 ml/min y eluyente 80:20 MeOH:H₂O).

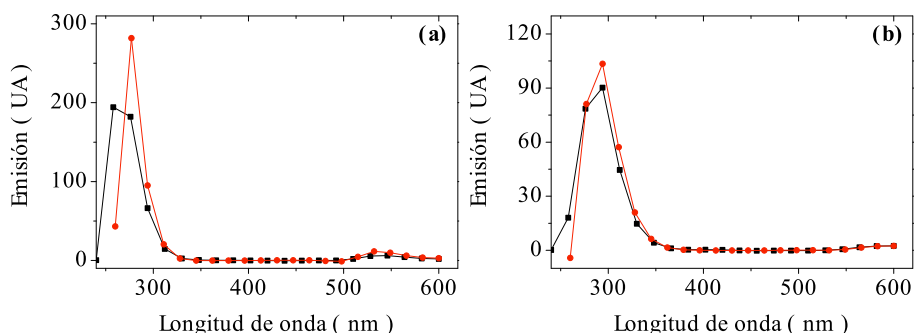


Figura 67. (a) Espectro de emisión a 5.52 min y (b) espectro de emisión a 10.15 min. En ambos casos excitando a 230 (■) y 250 nm (●). Fracciones **8** y **9** de la separación de CuCLsH1 isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μ l, flujo 1 ml/min y eluyente 80:20 MeOH:H₂O).

Tabla 23. Máximos de absorción, máximos de excitación y emisión máxima a esta longitud de onda de excitación, de las fracciones que eluyen en la separación en columna analítica, elución isocrática de CuCLsH1.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	1.37-1.38	—	370	413	Cu ₁₃
2	1.93-2.13	210	290	389	Cu ₁₁
3	2.43-2.45	—	230	396	Cu ₁₁
4	2.92	210, 309	—	—	Cu ₈
5	3.57	—	230	322	Cu ₆
6	3.72-3.92	210, 253	230	293	Cu ₄
7	4.37	210, 260-268	—	—	Cu ₅
8	4.55-4.50	—	250	538	Cu ₂₈
9	10.18-10.13	—	250	293	Cu ₄

B. CuCl_2H_2

La muestra CuCl_2H_2 se sintetizó mediante un proceso electroquímico con TBANO_3 en agua como electrolito soporte. Tras la síntesis se llevó a cabo un tratamiento térmico con el objetivo de aumentar el tamaño de los clústeres presentes. En la figura 68 aparecen representadas las propiedades ópticas de esta muestra.

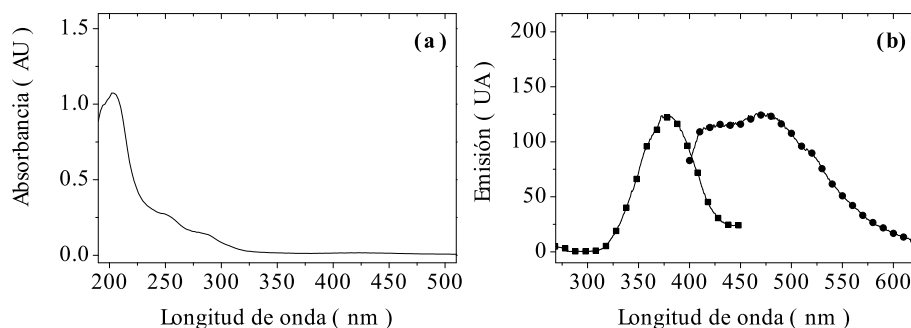


Figura 68. Propiedades ópticas de la muestra inicial CuCl_2H_2 : **(a)** espectro de absorción, **(b)** espectro de emisión excitando a 380 nm (■) y espectro de excitación a 480 nm de emisión (●).

El espectro de absorción muestra una predominancia de clústeres de pequeño tamaño (Cu_2 , Cu_4 y Cu_6) con bandas a 204, 253 y 290 nm, además de una banda de pequeña intensidad a 480 nm (Cu_{18}). Por otra parte, el espectro de emisión presenta un máximo de emisión a 480 nm al excitar a 380 nm, indicativa de un clúster de gran tamaño Cu_{20} . Además de esta emisión también presenta otros dos máximos de menor intensidad a 400 (Cu_{13}) y 300 nm (Cu_5) de emisión, cuando se excita, respectivamente, a 300 y 280 nm.

Para su separación se usó como eluyente una mezcla 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, con un volumen de inyección de 10 μl y un flujo de 1 ml/min.

En estas condiciones se estudió además la variación de los espectros de emisión a longitudes de onda de excitación de 230 a 410 nm. Los cromatogramas encontrados fueron complejos (figura 69), con muchas fracciones no resueltas del todo y tiempos de retención hasta los 14 minutos.

Pese al solapamiento de los picos y la complejidad del cromatograma, al analizar más detenidamente las propiedades ópticas de cada fracción (tabla 24) se comprobó que las fracciones eran relativamente puras, ya que, exceptuando la fracción **1** (con dos bandas en el espectro de absorción) y la fracción **6** (con dos máximos de excitación con sus correspondientes máximos de emisión bien diferenciados), cada una tiene unas propiedades ópticas bien definidas.

Al igual que ocurría en la de otras muestras, varios clústeres eluyeron a distintos tiempos de retención, indicando de nuevo la presencia de un clúster con entornos distintos.

En las figuras 70, 71 y 72 aparecen reflejadas las propiedades ópticas de algunas de las fracciones separadas.

Como se puede apreciar, la intensidad de la fluorescencia es mucho mayor que en las muestras de oro y plata, por eso esta muestra resultó tan interesante y se decidió separar las fracciones usando una columna preparativa y poder así estudiar su fluorescencia por separado.

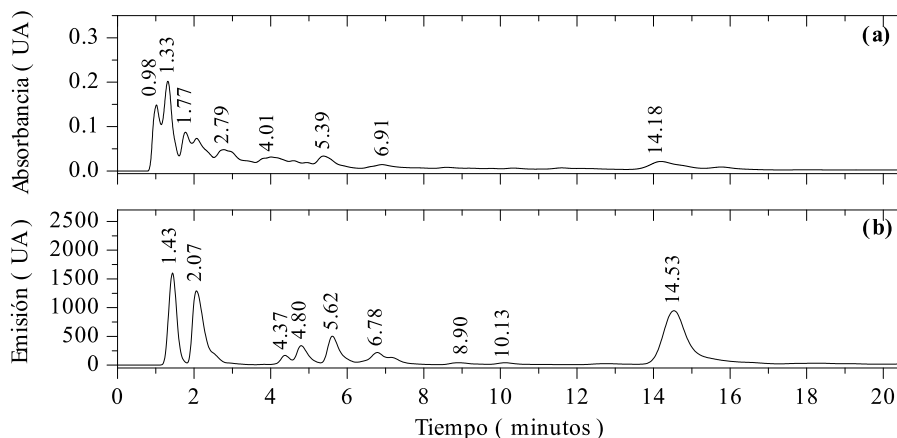


Figura 69. Cromatogramas de la muestra $\text{CuCl}_5\text{H}_2\text{O}$: **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 312 nm excitando a 270 nm. Separación isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 μl , flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

Tabla 24. Máximos de absorción, de excitación y emisión de las fracciones de la separación de CuCl₂H₂O.

Pico	TR/min	Abs./nm	Exc./nm	Em./nm	Clústeres
1	0.98	210, 251, 290	—	—	Cu ₄ , Cu ₆
2	1.33-1.48	210, 272	230, 250	293	Cu ₄
3	1.50-1.53	—	330	407	Cu ₁₂
4	1.77	210	—	—	—
5	2.07-2.23	—	270	295	Cu ₅
6	2.67-2.79	210, 317	330/390	404/488	Cu ₁₂ , Cu ₂₁
7	3.47	—	350	456	Cu ₁₇
8	3.88-4.01	210, 240, 294	390	466	Cu ₁₉
9	4.33-4.37	—	250	296	Cu ₅
10	4.80-4.97	—	230	293	Cu ₄
11	5.39-5.62	210, 253, 281	270	586	Cu ₃₆
12	5.95	—	230	279	Cu ₄
13	6.73-7.18	210, 250, 264, 284, 296	270	310	Cu ₅
14	7.67-7.77	—	310	363	Cu ₉
15	7.97	—	250	277	Cu ₄
16	8.70-9.03	—	310	348	Cu ₈
17	9.88-10.20	—	230	335	Cu ₇
18	10.65-10.67	—	310	379	Cu ₁₀
19	11.43	—	310	362	Cu ₈
20	12.62	—	230	294	Cu ₅
21	14.18-14.53	210, 228, 279	270	296	Cu ₅
22	16.03-16.15	—	330	372	Cu ₉
23	23.13-23.42	—	330	372	Cu ₉

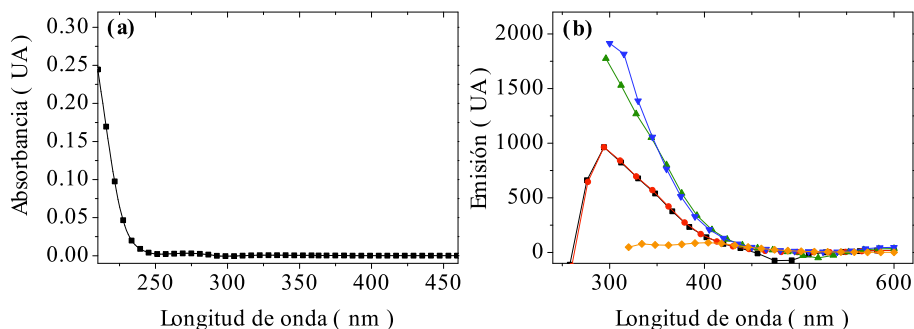


Figura 70. (a) Espectro de absorción a 1.44 min excitando a 230 (■), 250 (●), 270 (▲), 390 (▼) y 310 nm (◆). Fracción 2 de la separación de CuCl₂S₂H₂ isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

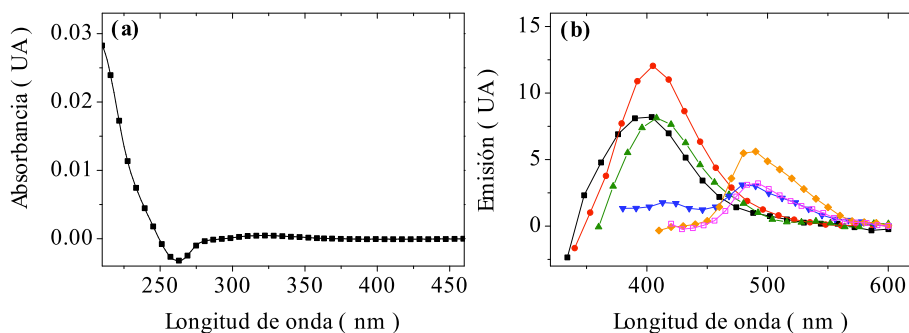


Figura 71. (a) Espectro de absorción a 2.75 min excitando a 310 (■), 330 (●), 350 (▲), 370 (▼), 390 (◆) y 410 nm (◻). Fracción 6 de la separación de CuCl₂S₂H₂ isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

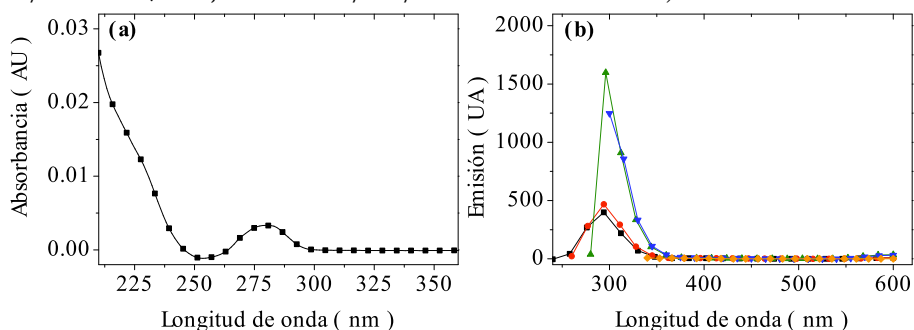


Figura 72. (a) Espectro de absorción a 14.41 min excitando a 230 (■), 250 (●), 290 (▲), 310 (▼) y 330 nm (◆). Fracción 21 de la separación de CuCl₂S₂H₂ isocrática, columna analítica C18 (volumen inyección 10 µl, flujo 1 ml/min y eluyente 65:35 CH₃CN:H₂O).

Esta muestra se introdujo también en la columna preparativa en condiciones equivalentes a las de la mejor separación en la columna analítica, 190 μ l, 20 ml/min y una fase móvil de 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$. En la figura 73 se muestran los cromatogramas de absorción y emisión excitando a 270 nm.

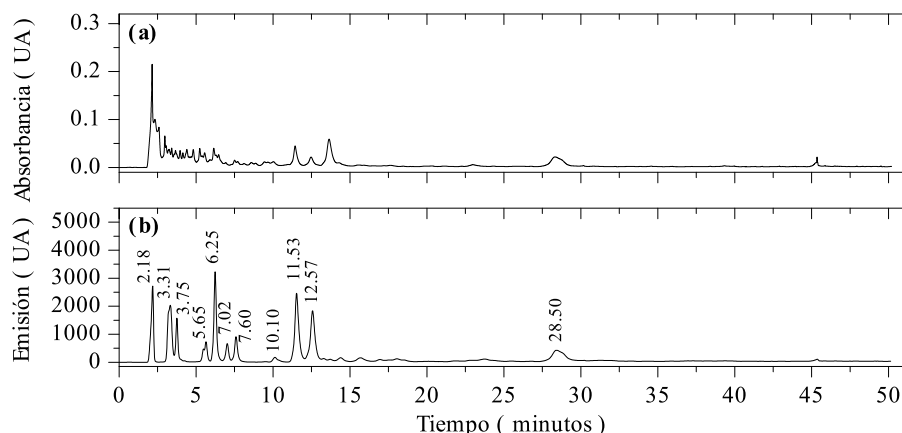


Figura 73. Cromatogramas de la muestra $\text{CuCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ **(a)** absorción a 224 nm y **(b)** emisión a 296 nm excitando a 270 nm. Separación isocrática, columna preparativa C18 (volumen inyección 190 μ l, flujo 20 ml/min y eluyente 65:35 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$).

El cromatograma de absorción no permitió discernir las distintas fracciones, esto es debido a que casi todas las fracciones presentan un máximo de absorción en torno a la misma longitud de onda, que en este caso solapa el resto de las absorciones debidas a los distintos clústeres presentes en la muestra. Sin embargo, el espectro de emisión, pese a no tener los picos totalmente resueltos permitió recoger por separado 12 fracciones distintas, que se concentraron a vacío, y se llevaron hasta un volumen de 1.5 ml con agua. Además también se recogió por separado todo el resto de la elución.

Todas las fracciones se caracterizaron mediante espectroscopía de fluorescencia, los resultados para todas las fracciones se pueden ver en las figuras 74 y 75. Los espectros tienen una buena intensidad, con lo que se pudo estudiar cada fracción con más detalle.

Por una parte se observó que las primeras siete fracciones corresponden al clúster Cu_5 , mientras que el resto presentan también un nuevo máximo de emisión a 296 nm cuando se excita a 414-108 nm, indicativo de la presencia

de un clúster de Cu_{12} . En un principio el objetivo de separar esta muestra consistió en aislar el clúster de mayor tamaño, sin embargo, a la vista de la caracterización de las fracciones parece no haber eluído. Lo que si se ha logrado es la separación del clúster Cu_5 de pequeño tamaño. Este clúster resulta interesante a nivel aplicado ya que en nuestro grupo de investigación se ha observado recientemente que presenta propiedades catalíticas.⁹² Disponer de él puro, sin posibles interferencias de otros clústeres de distinto tamaño resulta importante para el aprovechamiento de estas propiedades.

También se concentró, por separado, el resto de la elución, esto es, la fase móvil correspondiente a aquellos tiempos de retención en que no se observó ningún pico en el cromatograma de emisión excitando a 270 nm, tanto al principio y el medio como al final de la separación. En la figura 76 aparecen los máximos de emisión encontrados en esta muestra. Como se puede ver los restos de la elución presentaron emisiones relacionadas con la presencia de clústeres de Cu_5 , Cu_8 y Cu_{18} . En el caso de los dos últimos clústeres éstos se han perdido en la separación por haber tenido que fijar la longitud de onda de excitación en 270 nm a la hora de ir siguiendo la elución de los picos.

En este punto hay que recordar que el detector de fluorescencia permite hacer barridos de emisión manteniendo fija una longitud de onda de excitación. Normalmente, cuando se estudió la separación de una muestra con la columna analítica, el volumen de disolvente y muestra empleados es lo suficientemente pequeño como para poder realizar inyecciones consecutivas variando la excitación en cada caso, de esta forma se puede estudiar en profundidad los distintos clústeres que eluyen a lo largo del tiempo de cromatografía. Sin embargo, cuando se inyecta la muestra en la columna preparativa hay que elegir la excitación con que se quiere seguir la cromatografía, así que siempre se pierde algo de información, lo que resulta en la separación de unos clústeres determinados.

Así que variando la longitud de onda de excitación se podrían aislar de forma preferente unos clústeres frente a otros dentro de una mezcla compleja, como es el caso de la CuCLsH_2 .

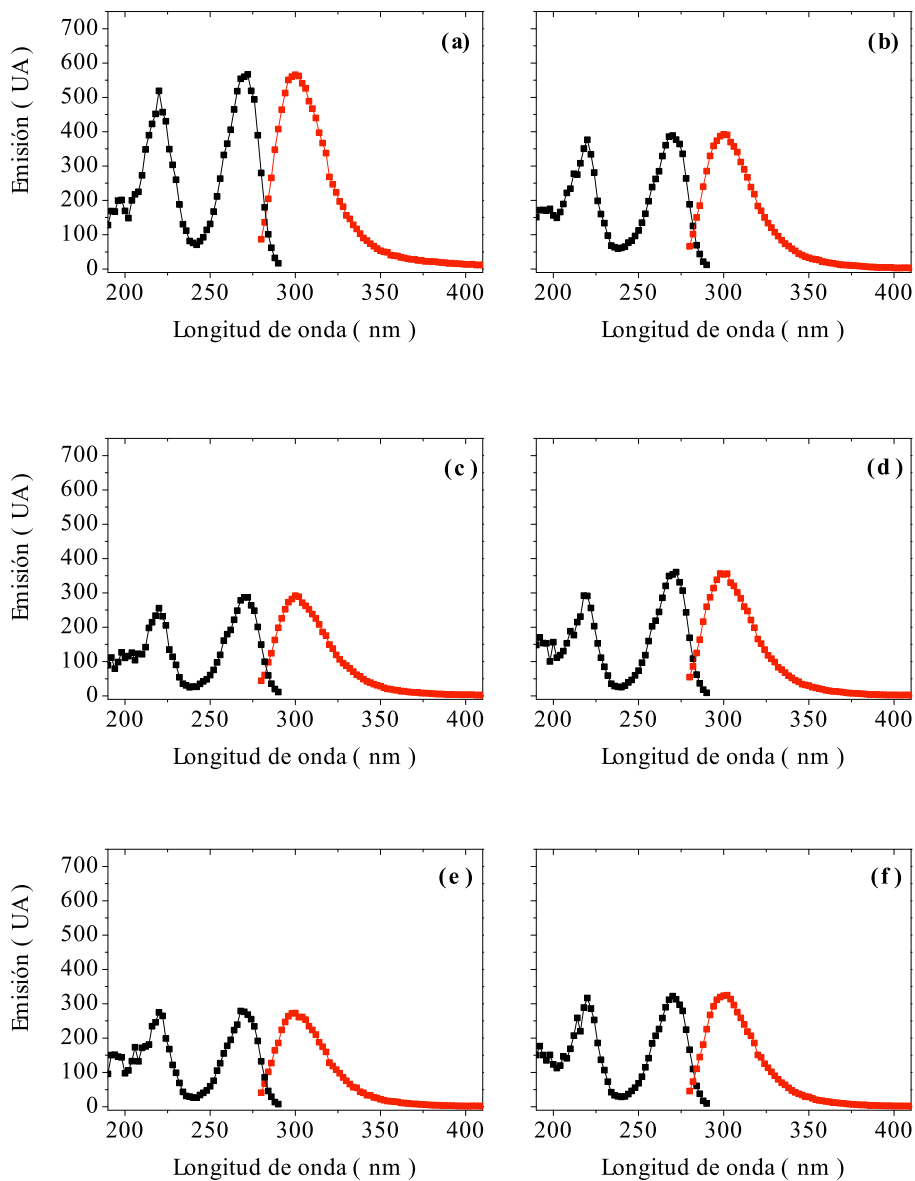


Figura 74. Espectros de emisión de las fracciones: (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5 y (f) 6. Barrido de excitación 300 nm de emisión (■), barrido de emisión a 270 nm de excitación (■).

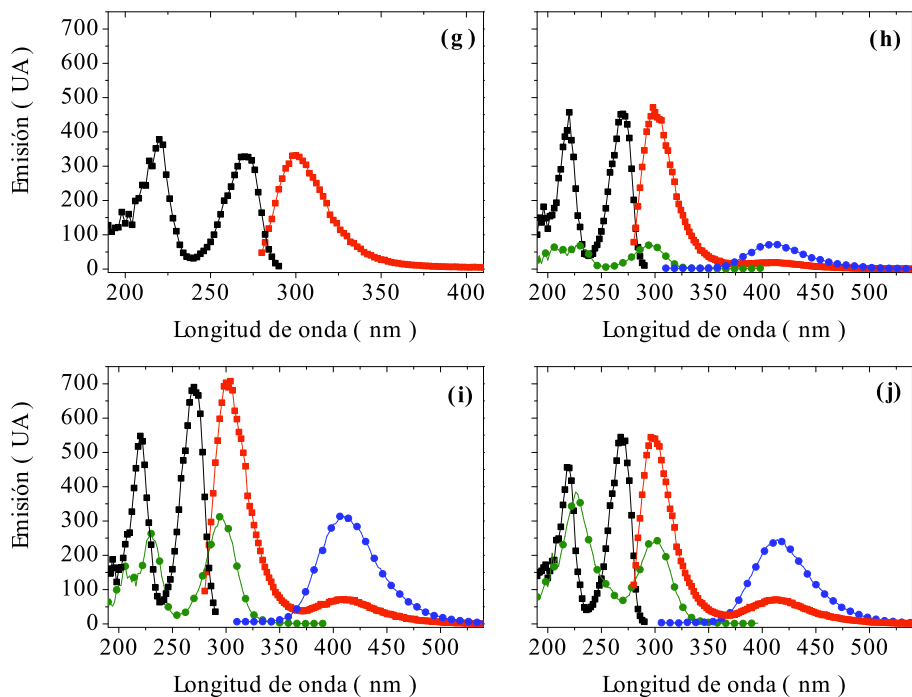


Figura 75. Espectros de emisión de las fracciones: (g) 7, (h) 8, (i) 9 y (j) 10. Barrido de excitación a 300 (■) y 414-408 nm de emisión (●), barrido de emisión a 270 (■) y 296 nm de excitación (●).

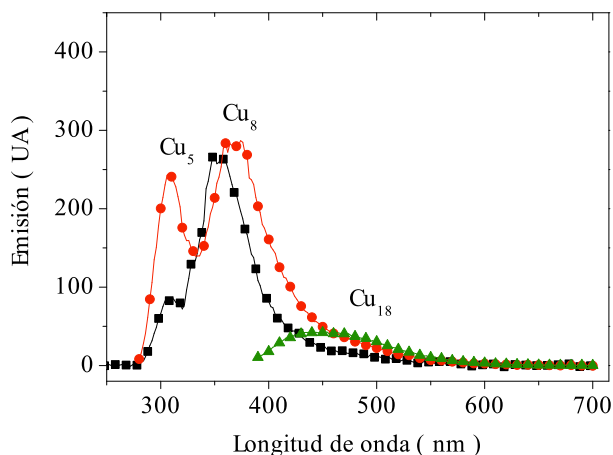


Figura 76. Espectro de emisión del resto de la separación de CuCl_2H_2 en la columna preparativa, excitando a 230 (■), 270 (●) y 380 nm (▲).

3.5 Conclusiones

Se ha llevado a cabo el estudio sistemático de la separación de distintas muestras de clústeres de oro, plata y cobre, procedentes de síntesis de varios tipos. En todos los casos se ha llegado a unas condiciones óptimas de separación, consiguiendo un fraccionamiento de las distintas muestras en base a los distintos clústeres presentes en las mismas. Se ha escalado la separación a una columna preparativa en el caso de las muestras más relevantes, consiguiendo la separación de las distintas muestras con éxito. Aunque sería necesario el juntar una mayor cantidad de cada fracción para poder hacer un estudio más detallado de sus propiedades.

Se hizo un estudio de las distintas variables de la elución, como son la fase móvil, el flujo y el volumen de inyección. En la tabla 25 están resumidas las condiciones óptimas de cada una de las muestras tratadas.

Tabla 25. Resumen de las condiciones óptimas de separación por HPLC de las distintas muestras estudiadas.

Muestra	Eluyente	Vol. inyección / μ l	Flujo/ ml·minuto ⁻¹
Au			
AuCLsH1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	2	1
AuCLsH2	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	1	1
Ag			
AgCLsH1	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	20	8
AgCLsH2	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	10	1
Cu			
CuCLsH1	80:20 MeOH:H ₂ O	10	1
CuCLsH2	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	10	1

Se puede observar como, en general, la separación de los clústeres se ve favorecida por mezclas de acetonitrilo y agua, frente al metanol. La proporción que mejores resultados dio fue de 65:35 de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, por lo que esta fase móvil parece la más adecuada para usar como punto de partida a la hora de enfrentarse a la separación de una mezcla de clústeres nueva.

A la vista de los resultados es complicado establecer una relación entre el orden de elución de un clúster determinado y su tamaño, ya que no se observó ninguna tendencia en este aspecto. Además, muchas veces un mismo clúster eluyó en varias fracciones distintas. Esto parece indicativo del hecho de que un mismo clúster se encuentra en entornos distintos, rodeado de distintas mezclas de moléculas de disolvente u otras moléculas presentes en la síntesis. Por eso resulta complicado poder predecir el orden de elución de una muestra determinada sin tener más información sobre los clústeres de partida que conforman la muestra.

Como se ha comprobado a lo largo de este capítulo, es complicado establecer sin duda la composición de una mezcla de clústeres a través del espectro de absorción y emisión de la muestra, sin embargo, con la ayuda de la cromatografía de HPLC se han podido estudiar mezclas complejas de clústeres de oro, plata y cobre, consiguiendo así una mayor información sobre la composición de cada una de ellas. Además de conseguir aislar clústeres de un determinado tamaño.

En definitiva, el HPLC no sólo se ha usado como método de purificación sino como método de caracterización.

4

Caracterización de clústeres de oro mediante EM

Como se ha visto a lo largo de los anteriores capítulos, se han conseguido sintetizar y separar clústeres de oro con propiedades fluorescentes y magnéticas muy interesantes. El espectro de absorción UV-vis proporciona una primera aproximación al tamaño de los clústeres presentes en cada muestra y su separación mediante HPLC ha proporcionado un medio para contar con muestras de clústeres con una pureza elevada. Esta última técnica amplía la información sobre la composición de la muestra. No obstante, la caracterización inequívoca de las fracciones obtenidas sigue siendo un reto al que puede dar respuesta la espectrometría de masas (EM). Esta se plantea como una buena opción, ya que ha sido una de las técnicas usadas más frecuentemente en el análisis cualitativo de moléculas orgánicas, por su alta especificidad, selectividad y límite de detección. En los últimos años se ha empezado a usar EM también en ciencia de materiales para el análisis e identificación de nanopartículas y clústeres de distintos tipos.

Los primeros en usar la espectrometría de masas para la identificación de clústeres de oro fueron Pignolet, Fakler *et al.* En 1987 usaron como fuente de ionización el bombardeo con átomos rápidos (FAB -fast atom bombardment-) para la determinación de clústeres catiónicos mixtos de oro y otros metales de transición; más tarde, en 1993 mediante desorción de plasma de ^{252}Cf (^{252}Cf PD -plasma desorption-) trataron de caracterizar clústeres de Au_{55} , aunque en ambos casos se encontraron con que la fragmentación de los clústeres impedía la asignación de una fórmula exacta.^{93, 94}

Whetten *et al.* introdujeron en 1996 el uso de desorción-ionización por láser con y sin matriz (MALDI -matrix assisted laser desorption ionization- y LDI -laser desorption ionization- respectivamente) para la caracterización clústeres de oro pasivados con alquiltioles.¹³ Con ambas técnicas se producía fragmentación y agregación de los clústeres, aunque ambas se reducían notablemente con el uso de una matriz. Para solucionar este problema dos años más tarde se propuso la ionización por electrospray (ESI -electrospray ionization-) en un trabajo pionero para el estudio de clústeres de oro protegidos con el tripéptido tiolado glutatión, de esta forma se trataba de facilitar la medida al contar con una molécula biológica más parecida a lo que normalmente se mide mediante estas técnicas.⁶⁵ Más tarde Shaaff hizo un estudio más profundo sobre el proceso de (MA)LDI, destacando la influencia de la intensidad del láser en la energía total que alcanza la muestra y la importancia de conocer el mecanismo del proceso de ionización que se produce, aunque no consiguió eliminar la fragmentación mediante esta técnica.⁹⁵ Uno de los grupos que han usado con éxito ESI para la caracterización de clústeres de oro fueron los de Tsukuda y Cliffel, usando como agentes protectores glutatión y tiopronina, respectivamente.^{34, 96}

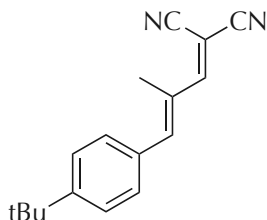


Figura 77. Estructura del DCTB.

Más recientemente Murray, Dass *et al.* obtuvieron un espectro de MALDI de clústeres medios de oro ($\text{Au}_{25}(\text{SR})_n$) con una fragmentación mínima, empleando DCTB (2-[(2E)-3-(4-*tert*-butilfenil)-2-metilprop-2-enilideno] malonitrilo, figura 77) como matriz.^{97, 98} Una de las razones de este logro se debe a que la alta fragmentación en esta técnica de masas viene determinada por las altas intensidades del láser que se tienen que usar para conseguir la desorción e ionización de la muestra y el DCTB es una matriz que promueve la tranferencia electrónica al y del analito a bajas intensidades del láser, tanto en positivo como en negativo.

Por otra parte, Murray *et al.* probaron una técnica de masas tandem de disociación inducida por colisión de baja energía (CID MS/MS -collision induced dissociation),⁹⁹ haciendo un estudio detallado de las fragmentaciones que ocurren para nanopartículas de Au₂₅ recubiertas con diferentes tioles y destacando la importancia del recubrimiento en el proceso de ionización.

Con estos precedentes, en esta tesis se usaron las técnicas de (MA)LDI y ESI para la caracterización de clústeres de oro de pequeño tamaño, examinando las diferentes variables que pueden afectar a la medida.

(MA)LDI es una técnica de superficie en la que se lleva a cabo la desorción de la muestra (o la muestra con la matriz) depositada en estado sólido sobre una placa, liberándose al vacío tras la irradiación con láser. Normalmente el sistema está acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (TOF -time of flight-). La ionización se produce por medio de reacciones ión-molécula en la nube que se forma tras la ablación del láser. Hay varias teorías sobre las reacciones que tiene lugar para llegar a la formación final de los iones que llegan al analizador de masas, la más extendida consiste en un proceso en dos pasos.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ En una primera etapa se generan los iones primarios a partir de las moléculas neutras de la muestra, a menudo se trata de especies derivadas de la matriz; en una segunda etapa estos iones interaccionan entre sí y con las moléculas neutras, para dar lugar sobre todo a iones del analito. Finalmente en el espectro de masas se observarán tanto los iones primarios como los secundarios.

A la hora de interpretar el espectro es importante conocer este proceso de ionización, aunque no siempre es fácil, ya que los mecanismos que pueden tener lugar pueden ser muy variados y además se ve afectado por distintos factores, como la naturaleza de la matriz, las propiedades físico-químicas del analito, la concentración, el método de preparación de la muestra, las características del láser y el medio que rodea la muestra. Un ejemplo de esto sería la supresión de picos de la matriz o de la muestra dependiendo de la proporción de muestra/matriz depositada en la placa de medida.

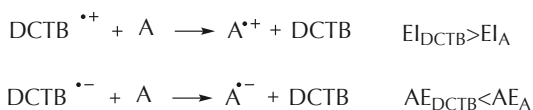
Uno de los mayores problemas en el análisis de clústeres de oro mediante MALDI es su bajo peso molecular, que entra dentro del mismo rango que la mayoría de las matrices utilizadas, así que su detección puede verse enmascarada por la generación y detección de iones de la matriz. Este es un

problema común en el análisis de péptidos de bajo peso molecular y en la bibliografía pueden encontrarse distintas soluciones, como el uso de películas metálicas, nanopartículas, nanotubos de carbono o quantum dots como matrices, aunque estos últimos no han dado muy buen resultado hasta el momento.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ El problema de emplear películas metálicas y nanopartículas radica en que al ser sustratos parecidos a la muestra podrían existir interferencias en la medida. Los nanotubos de carbono se perfilan como una buena solución ya que pueden transferir energía al analito bajo la irradiación del láser sin generar ninguna señal en el espectro,¹⁰⁷ sin embargo la síntesis y manipulación de los nanotubos de carbono no resulta trivial.

En la técnica MALDI normalmente se deposita una gota de una disolución de la muestra sobre una superficie sólida (generalmente de acero) que es irradiada con el láser. Resulta especialmente importante el método de preparación de la muestra para asegurar la homogeneidad y reproducibilidad de los resultados, así como para facilitar la ionización y desorción de la muestra.

Aunque son muchas las matrices que existen en el mercado, una de las más recomendadas para la determinación de metales y compuestos lábiles que requieran el uso de bajas intensidades del láser es el DCTB, inicialmente utilizado por Luftmann *et al.* para fullerenos sustituidos.¹⁰⁹ La estructura de esta matriz puede verse en el figura 77.

Esquema 7. Proceso de ionización del analito mediante transferencia electrónica del DCTB.



Drewello *et al.* hicieron un estudio detallado de la termodinámica del DCTB y los diferentes procesos de ionización que pueden tener lugar durante el proceso de MALDI.¹¹⁰ Mostraron que esta matriz tiene una termoquímica favorable para dar lugar a reacciones de transferencia electrónica permitiendo la formación tanto de iones positivos como negativos del analito. Las reacciones que tendrían lugar aparecen representadas en el esquema 7.

Para que se formen iones positivos del analito, la energía de ionización (EI) tiene que ser menor que la del DCTB, mientras que para la formación de iones negativos su afinidad electrónica (AE) ha de ser mayor. Los valores calculados por Drewello *et al.* para el DCTB son: EI 8.5 eV y AE 2.0-2.3 eV.

A la hora de depositar la muestra en la placa de medida existen varias técnicas. La más común consiste en depositar una gota de la mezcla de la muestra y la matriz directamente y dejar que se evapore el disolvente (dried droplet application). Una variante de esta técnica consiste en la mezcla sobre la misma placa, depositando primero una gota de la muestra y a continuación una gota de la matriz. Para aumentar la sensibilidad en el caso de muestras más diluidas se puede hacer la deposición sucesiva de la matriz y la muestra, en este orden, esperando a que se evapore el disolvente entre cada deposición (thin layer application). Tras el secado de la gota de muestra se realizarían una serie de lavados con agua, depositando una gota encima de la muestra y eliminando el agua por simple arrastre con una corriente de aire o con una pipeta. Este proceso de lavado se suele llevar a cabo para eliminar el exceso de matriz o sales que pueda haber disueltas en la muestra y favorecer así la cristalización sobre la placa.

En este trabajo se han llevado a cabo diferentes estudios para optimizar la deposición de los clústeres, con el fin de evitar la fragmentación y la agregación, aunque sigue siendo complicado lograr un espectro limpio del ion molecular. Se han descrito síntesis de clústeres de distintos metales, entre ellos oro y plata, mediante ablación de láser, en condiciones similares a las usadas en la técnica de MALDI.^{111, 112} En general es difícil la identificación de los clústeres presentes en la muestra de forma inequívoca, ya que existe la posibilidad de que los picos observados en el espectro sean debidos a la fragmentación o agregación de clústeres mayores y/o a la generación de clústeres por la presencia de iones del metal en la muestra. Por este motivo en este trabajo se empleó también una técnica más suave como ESI (electrospray ionization -ionización por electroespray-) de apoyo en la caracterización de los clústeres.

La espectrometría de masas ESI es una técnica de ionización suave que produce, en principio, una baja o nula fragmentación y que permite el estudio de la estructura, composición y estabilidad de materiales en disolución. Fue

precisamente esta característica la que propició el aumento de la popularidad de la técnica, ya que ofrece la posibilidad de investigar especies en disolución a concentraciones bajas y en mezclas relativamente complejas. La ionización se produce mediante la nebulización de la muestra, la disolución se eluye de un capilar a una cámara a presión atmosférica produciendo un fino spray de gotas altamente cargadas debido a la presencia de un campo eléctrico intenso.¹¹³ La evaporación del disolvente, asistida por un flujo de nitrógeno, convierte las gotas cargadas en iones en fase gaseosa, que son conducidos a la cámara de alto vacío del analizador de masas. Como la muestra se inyecta en estado líquido se acopla perfectamente a la técnica de separación de HPLC.

Una de las ventajas de esta técnica de ionización es la formación de iones moleculares intactos del analito. Por otra parte su fragmentación puede ser inducida, si se deseara, aumentando el voltaje del cono (CID).

Otra de las ventajas de esta técnica es que se pueden formar compuestos con carga múltiple, lo que hace posible la detección de moléculas con una gran masa que de otra forma estarían fuera del rango del detector. Esto es debido a que en el espectro de masas aparece reflejada la relación masa/carga, al aumentar la carga disminuirá este valor, llevándolo a valores detectables.

Para obtener un buen espectro de ESI hay que considerar una serie de variables, como son el disolvente y la preparación de la muestra. Si el analito está cargado será adecuado cualquier disolvente moderadamente polar, preferiblemente con una volatilidad razonable para que se pueda eliminar fácilmente durante el proceso de ESI. Los más comunes son el metanol, etanol, acetonitrilo y agua. Sin embargo, si se trata de analizar un compuesto neutro es preferible usar un disolvente con una polaridad elevada para favorecer la formación del electrospray. Como ya se mencionó, las concentraciones requeridas no son muy altas, aunque habrá que ajustarlas para la obtención de una buena relación señal/ruido. En el caso de analitos neutros también se puede añadir un agente que promueva la formación de iones. Aunque normalmente son suficientes los cationes y aniones presentes en los disolventes más comunes almacenados en botellas de vidrio, como es el caso del agua (Na^+ , K^+ y NH_4^+) y el acetonitrilo (NH_3 , NH_4^+ y CN^-), en algunos casos para facilitar la interpretación del espectro se puede añadir una pequeña

cantidad extra de un compuesto iónico, como pueden ser ácidos, metales alcalinos, sales de amonio, sales de plata, iones alcóxido, piridina o cloruros.

Hay que tener especial cuidado con la contaminación cruzada. El capilar de entrada de la muestra se puede contaminar fácilmente, pudiendo eluir durante las medidas siguientes moléculas procedentes de muestras anteriores. Así que es importante evitar la presencia de sales que puedan cristalizar en el capilar de entrada al electrospray. Una recomendación general suele ser el introducir la muestra lo más diluida posible e ir incrementando la concentración progresivamente hasta obtener un buen espectro.

Uno de los parámetros instrumentales más importante es el voltaje del cono, que es el que acelera los iones y lleva a colisiones ión-molécula de alta energía, pudiendo producir la fragmentación del analito. Determina qué iones se observan en el espectro, por lo que requiere su ajuste para cada nueva muestra. Además, valores elevados pueden producir fragmentación, a la vez que aumenta la intensidad de la señal, por lo que hay que encontrar un valor de compromiso para lograr un espectro con una buena intensidad sin llegar a la fragmentación.

En este trabajo se usaron dos espectrómetros de masas ESI distintos: un QqTOF y un LTQ-Orbitrap. Ambos equipos se encuentran acoplados a un HPLC, de forma que la introducción de la muestra se puede hacer de forma directa o a través del cromatógrafo. Las iniciales de los espectrómetros hacen referencia a los analizadores que llevan a cabo la separación de los iones, de acuerdo a su relación m/z .

El primero, QqTOF, se trata de un espectrómetro *tándem*, que consta de dos analizadores de masas situados consecutivamente (MS/MS). El primero es un cuadrupolo (Q-quadrupole-) y funciona como un filtro de masas capaz de seleccionar un ión determinado que a continuación se fragmenta en una celda de colisión. A continuación el analizador de tiempo de vuelo (TOF-time of flight-) se encarga de registrar el espectro de los iones “hijos” que se generan al fragmentarse el ión seleccionado por el cuadrupolo.¹¹³

El segundo, LTQ-Orbitrap, se trata de un sistema híbrido con una doble trampa de iones.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Este instrumento combina una trampa lineal de iones (LTQ) con eyección radial y un analizador de masas Orbitrap. Este último

consiste en una trampa electrostática en la que los iones rotan alrededor de un electrodo central.

4.1 Muestras analizadas

Se analizaron clústeres de oro sintetizados químicamente por medio de una síntesis desarrollada en nuestro grupo de investigación por María Rodríguez.

En líneas generales la síntesis consiste en al adición de una disolución 50 mM de THAClO_4 (perclorato de tetrahexilamonio) en tolueno sobre otra 30 mM de HAuCl_4 en agua. La mezcla se agita hasta que se observa la completa extracción del oro a la fase orgánica y a continuación se reduce añadiendo alícuotas de una disolución acuosa de NaBH_4 (50 mM) de 50 μl cada 20 minutos hasta un total de 1.2 ml.

Al terminar la reacción se separan las fases. La fase orgánica se lava con ácido sulfúrico 0.01M y agua para eliminar los restos de reductor y cationes de oro que hayan quedado sin reaccionar. Se obtiene así una disolución de clústeres de oro en tolueno. La evolución del espectro de absorción UV-vis de la fase orgánica, una vez separada de la fase acuosa y lavada con ácido sulfúrico y agua, se puede ver en la figura 78. La intensidad del pico a 300 nm va disminuyendo al ir añadiendo el reductor.

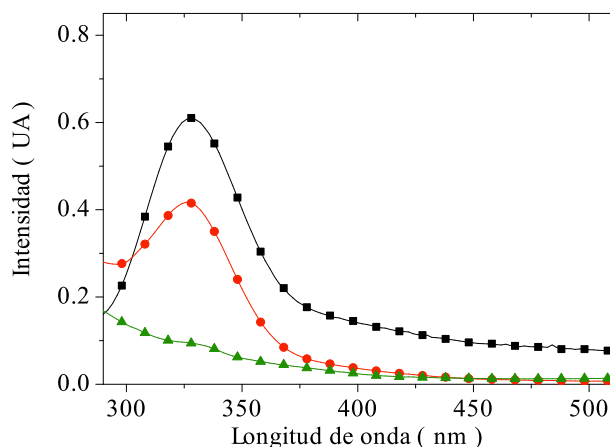


Figura 78. Espectro de absorción UV-vis de la muestra de clústeres de oro tras añadir 0 ml (■), 0.6 ml (●) y 1.2 ml (▲) de NaBH_4 50 mM.

4.2 (MA)LDI

En esta técnica los parámetros a optimizar fueron los siguientes:¹¹⁷

- **Intensidad del láser.** Intensidad del láser con el que se produce la desorción e ionización de la muestra. Su valor óptimo depende de la muestra y de la matriz usada en la medida. Generalmente se expresa como porcentaje de la intensidad total del láser. Es muy importante su control, a intensidades muy altas puede producirse la formación de aductos o la fragmentación de los clústeres e intensidades bajas pueden no resultar suficientes para la desorción de la muestra. Esta intensidad de la radiación está directamente relacionada con la intensidad total del espectro.
- **Disparos.** Número de espectros registrados en cada destello del láser. Este parámetro afecta a la relación señal/ruido, un aumento en el número de disparos aumenta también el tiempo de adquisición y ayuda a promediar el ruido.
- **Voltaje de aceleración.** Define la energía de los iones mientras estos vuelan hacia el detector. La eficacia de la detección aumenta con esta energía, sobre todo para iones de masas altas.
- **Tiempo de demora.** El tiempo (ns) después de que el láser ionice la muestra, hasta que se aplica el voltaje de aceleración total. Esto crea un gradiente de potencial que acelera los iones. Hay que optimizarlo en conjunto con el voltaje de rejilla. En general masas altas requieren tiempos de demora más elevados. Es también dependiente de la matriz empleada.
- **Voltaje de rejilla.** Es el voltaje aplicado a la rejilla situada sobre el plato de la muestra. El rango válido viene determinado por el voltaje de aceleración y se optimiza en conjunto con el tiempo de demora. Un voltaje alto de rejilla con una diferencia de potencial baja disminuye la fragmentación de los iones.

La técnica cuenta además con dos modos de medida: lineal, en que los iones son enviados directamente de la fuente de ionización al detector, y reflector, en que son reflejados con un determinado ángulo de incidencia antes de ser enviado al detector. El modo lineal suele usarse generalmente para masas muy altas, ya que normalmente da menos resolución a la hora de las masas más pequeñas, por lo que nosotros usamos el modo reflector.

Inicialmente se hizo un estudio de cómo afectan cada uno de estos parámetros en la medida final, para facilitar el proceso de optimización a la hora de medir las muestras. En la figura 79 aparecen representados los espectros de masas de la muestra de oro a distintas intensidades, manteniendo constantes el resto de los parámetros.

A intensidades bajas a penas se produce desorción de la muestra, el espectro presenta una intensidad muy baja. No es hasta un 45% de intensidad del láser que empiezan a observarse picos, a partir de ahí el espectro se hace progresivamente más intenso, hasta que llegado a un punto se estanca.

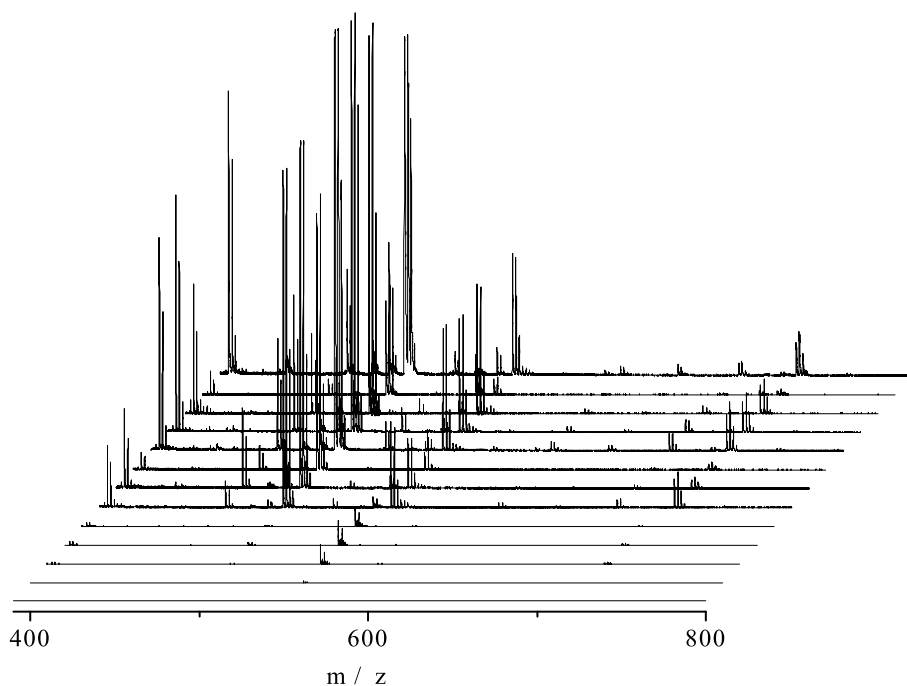


Figura 79. Espectros de masas LDI de la muestra de clústeres de oro variando la intensidad del láser (250 disparos, 15 ns de demora, 65% de voltaje de rejilla y 10 kV de voltaje de aceleración). De delante atrás: de un 35 a un 59% con variaciones del 2%.

Para poder comparar mejor lo que ocurre a las intensidades más altas los espectros se encuentran representados en la figura 80. La intensidad de la

mayor parte de los picos es la misma, aunque se puede ver que la intensidad del pico a 400 uma va aumentando, lo que puede indicar la presencia de fragmentación a intensidades de láser muy elevadas.

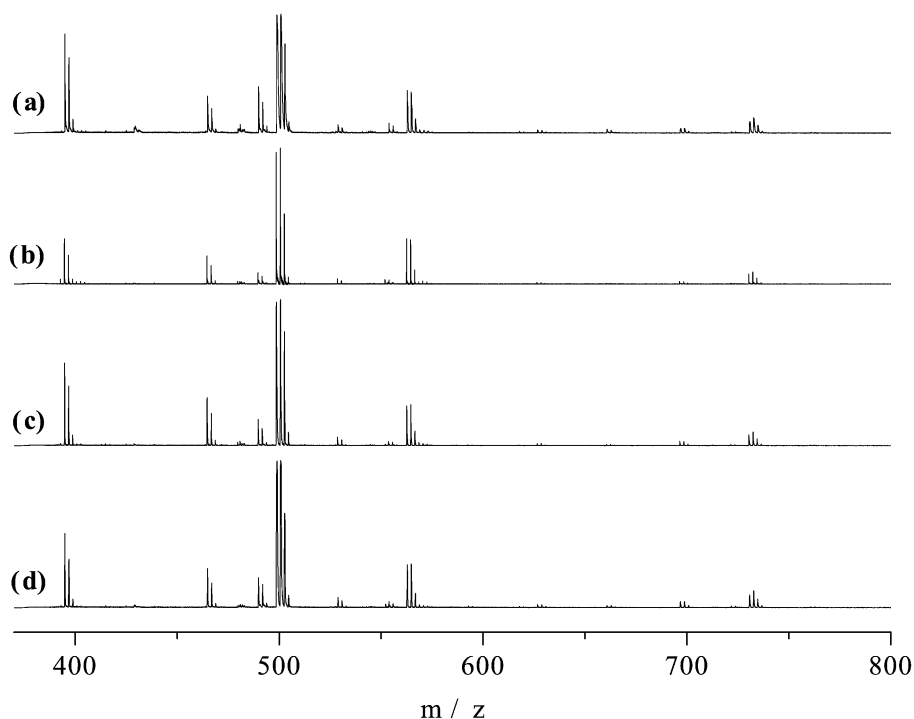


Figura 80. Espectros de masas LDI de la muestra de clústeres de oro variando la intensidad del láser: **(a)** 59%, **(b)** 55%, **(c)** 53% y **(d)** 51% (250 disparos, 15 ns de demora, 65% de voltaje de rejilla y 10 kV de voltaje de aceleración).

Hay que mencionar que existe una discordancia al aplicar una intensidad del 57%, por eso se ha eliminado de la figura 80. Este tipo de discordancias es común cuando se miden espectros de MALDI, la medida se ve muy afectada por los efectos de cristalización de la muestra y por lo tanto a veces es complicado evaluar el efecto de cada parámetro.

El efecto del número de disparos se encontró dependiente de la intensidad del láser, aunque a intensidades bajas y medias la tendencia es que un aumento del número de 250 a 500 disparos produce un aumento en la intensidad de la

señal. En la figura 81 se puede ver la comparativa de los espectros tomados con una intensidad del 46%.

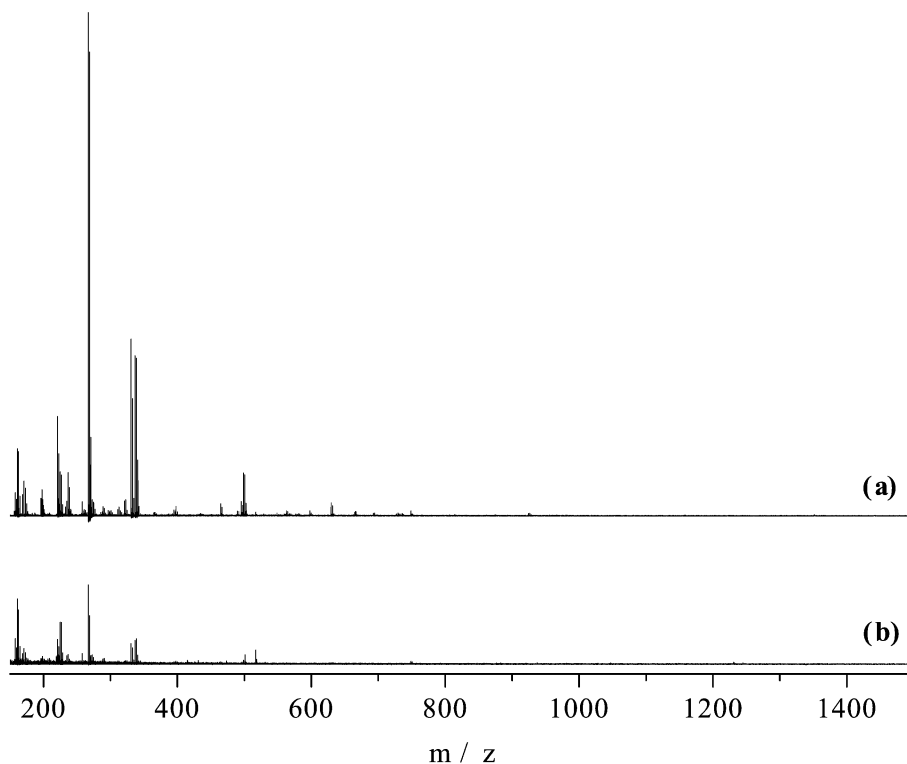


Figura 81. Espectros de masas LDI de la muestra de clústeres de oro con **(a)** 500 y **(b)** 250 disparos, **(46% de intensidad del láser, 200 ns de demora, 65 % de voltaje de rejilla y 10 kV de voltaje de aceleración).**

Al seguir aumentando la intensidad del láser hasta un 52%, el aumento en el número de disparos por encima de 200 provoca un aumento en el ruido en relación con la señal (figura 82) de ahí la disminución global de la intensidad del espectro.

Esto indica que cuanto mayor sea la intensidad del láser menos número de disparos se necesitan, ya que al aplicar una mayor energía sobre la muestra, además de desprenderse moléculas del analito, también lo pueden hacer contaminantes, lo que provocaría el aumento observado en el ruido.

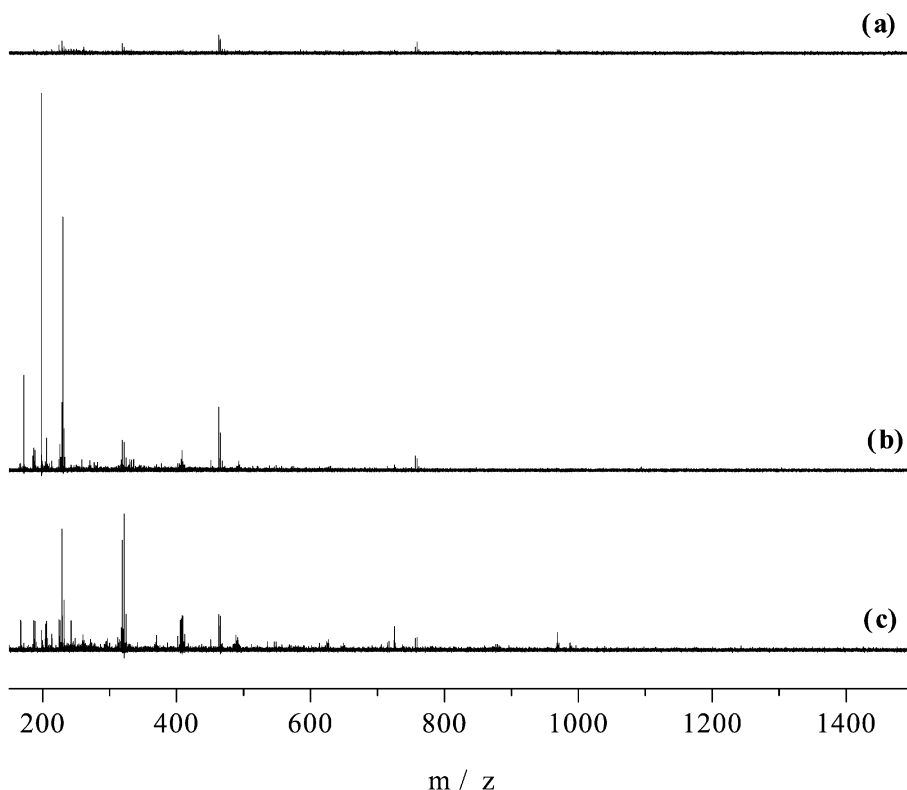


Figura 82. Espectros de masas LDI de la muestra de clústeres de oro con **(a)** 250, **(b)** 200 y **(c)** 150 disparos, **(52% de intensidad del láser, 200 ns de demora, 65 % de voltaje de rejilla y 10 kV de voltaje de aceleración).**

El tiempo de demora y el voltaje de rejilla se optimizaron conjuntamente. Aunque se observó que cambios en estos parámetros producen un cambio notable en la intensidad y el ruido es difícil establecer una tendencia.

En la figura 83 se pueden ver varios espectros con distintos valores de estos parámetros. Al hacer una ampliación del espectro en la zona en que aparecerían los clústeres de mayor tamaño (figura 84) con unas condiciones de 200 ns de tiempo de retardo y un 65% de voltaje de rejilla se consigue resolver un pico a 1230 uma. Este pico se observó en varias de las medidas realizadas, por lo que no se trata de ruido.

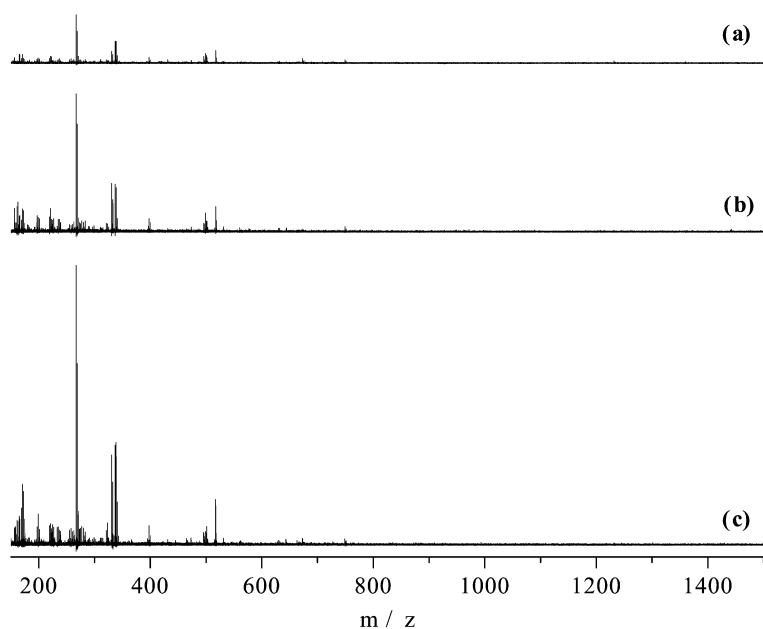


Figura 83. Espectros de masas de la muestra de clústeres de oro variando el tiempo de demora (**d**) y el voltaje de rejilla (**vr**): **(a)** d 200, vr 65; **(b)** d 100, vr 65 y **(c)** d 50, vr 20 (44% de intensidad del láser, 100 disparos y 10 kV de voltaje de aceleración).

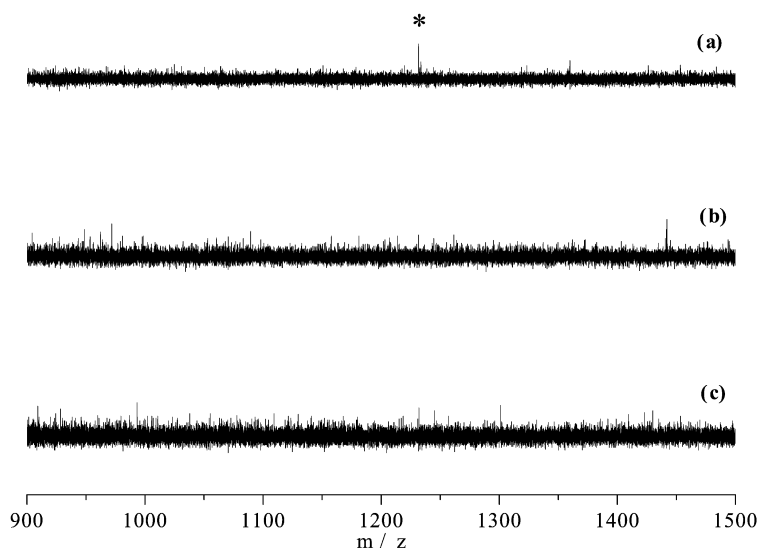


Figura 84. Ampliación de la zona de masa altas de los espectros de masas de la muestra de clústeres de oro variando el tiempo de demora. Mismas condiciones y leyenda que la figura 83.

En cuanto al voltaje de aceleración, resulta fuertemente dependiente del tipo de muestra y de cómo esté cristalizada sobre el plato de medida. Como se puede ver en la figura 85, una variación en su valor puede cambiar drásticamente el espectro.

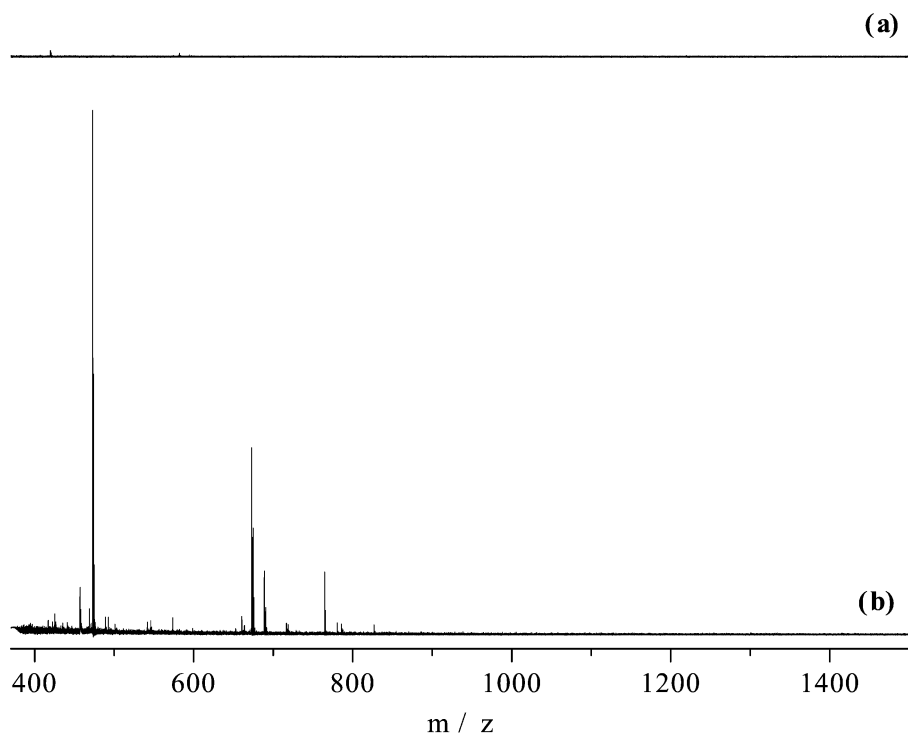


Figura 85. Espectros de masas MALDI con DCTB de la muestra de clústeres de oro con voltajes de aceleración diferentes: **(a)** 20 kV y **(b)** 15 kV. (64% de intensidad del láser, 250 disparos, 100 ns de demora y 65% de voltaje de rejilla).

Como se puede deducir de este primer estudio la optimización es necesaria en cada medida porque existe una gran variabilidad en los espectros que se obtienen al cambiar un poco las condiciones.

Además de la muestra también se registró para cada una de las condiciones, el espectro de un blanco, preparado de manera análoga a la muestra, pero sin la adición del reductor, por lo que no están presentes los clústeres. De esta forma, además de poder asignar y descartar los picos debidos a la sal de tetraalquilamonio, se pueden eliminar aquellos clústeres que puedan haberse formado por la incidencia del láser en los cationes de oro sin reducir presentes

en la muestra, ya que en el blanco la concentración de iones será muy superior a la máxima posible en las condiciones de síntesis.

La sal de tetrahexilamonio está en una concentración bastante elevada en las muestras, así que los picos debidos a ella son los más intensos, a 354 uma en positivo (THA^+) y 99 uma en negativo (ClO_4^-). Como aparecen a masas bajas, tras la optimización del espectro completo (de 90 a 4000 uma) se repite la medida suprimiendo las masas inferiores a 370 uma, para poder aumentar la resolución de los picos de interés. De esta forma se obtuvieron los espectros de masas (MA)LDI en distintas condiciones y se llevó a cabo un estudio pormenorizado de los picos que aparecen en cada caso, eliminando los que se encuentran también en el blanco. La asignación de cada uno se hizo con ayuda de la distribución isotópica en los casos correspondientes.^{xi}

Los primeros estudios se realizaron por espectrometría de masas LDI, sin matriz, depositando una gota de la muestra sobre el plato de medida. En la figura 86 se representan los espectros de masas de la muestra tanto positivo como negativo. El espectro positivo es mucho más intenso y sólo se observa el pico del ión de THA. En el espectro negativo los picos más intensos corresponden al blanco, sin embargo aparecen a masas altas picos de clústeres de 12, 14 y 19 átomos de oro (* en la figura 86). Siendo mucho más intensos los picos debidos a los clústeres pares de Au_{12} y Au_{14} que el de Au_{19} .

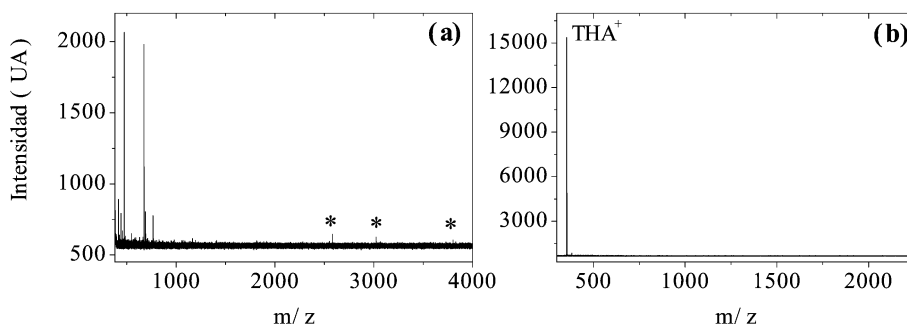


Figura 86. Espectros de masas LDI de la muestra de clústeres de oro: **(a)** negativo y **(b)** positivo. Señalados (*) los clústeres de oro presentes en la muestra.

^{xi} El software empleado para la simulación de las distribuciones isotópicas y el cálculo de las masas fue: iMass, versión 1.1 (2J05), desarrollado por Urs Roethlisberg usando como referencia: Handbook of chemistry and physics, 74th ed. CRC Press: Boca Ratón FL, 1993; Roockwood AL; Van Orden SL, Smith RD *Anal. Chem.* **1995**, 63, 2699.

No todos los picos pudieron ser asignados inequívocamente. En la tabla 26 aparece una relación de los picos del espectro negativo asignados a clústeres de oro. En general son clústeres grandes, rodeados de moléculas de disolvente (agua y tolueno), así como iones sulfato y perclorato que se encuentran presentes durante la síntesis.

Tabla 26. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en LDI negativo. **Tol** tolueno.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
2581.60	2581.49	$[\text{Au}_{12}\text{NaClO}_4\text{SO}_4]^-$
3022.60	3022.57	$[\text{Au}_{14}\text{NaSO}_4(\text{Tol})(\text{H}_2\text{O})_3]^-$
3801.50	3801.38	$[\text{Au}_{19}\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_2]^-$

La intensidad de los picos de los clústeres es muy pequeña comparada con la intensidad de la sal. Para poder compensar esto se probó a cambiar las condiciones de deposición. Se depositó varias veces consecutivas la muestra, haciendo varios lavados con agua. Al aumentar el número de deposiciones también aumenta, pese a los lavados, la concentración de la sal y hay que aumentar mucho la intensidad del láser para poder observar algún pico en el espectro (hasta un 66%). En estas condiciones no se observó ningún pico que no estuviera en el blanco.

Los mejores espectros se obtuvieron con cuatro deposiciones de la muestra y dos lavados con agua. Como se puede ver en los espectros de LDI (figura 87) los clústeres siguen apareciendo en una proporción y cantidad muy pequeña.

Sin embargo, pese a la mayor resolución de los espectros los clústeres observados fueron distintos. En estas condiciones tanto en positivo como en negativo sólo aparecieron clústeres Au_2 . En el caso del espectro negativo la intensidad de los picos de los clústeres es mejor que en positivo y que al depositar la muestra una sola vez y sin lavados.

Esta discrepancia en los clústeres observados en ambas condiciones de deposición se puede explicar en base al efecto que tiene el realizar varias deposiciones a la hora de la cristalización de la muestra en la superficie del

plato de medida. Al aumentar el número de deposiciones de muestra aumenta la eficacia del “aislamiento” de los clústeres en la matriz que formaría la sal de THA (presente de forma mayoritaria en la muestra), de esta forma aparecen en el espectro las unidades de Au_2 realmente presentes en la muestra. A la luz de estos resultados, los clústeres de Au_{12} , Au_{14} y Au_{19} detectados con una sola deposición responderían a la asociación de clústeres pequeños de Au_2 .

En las tablas 27 y 28 aparecen resumidos los resultados obtenidos. De acuerdo con ellos, en el espectro negativo los clústeres de dos átomos de oro aparecen rodeados, además de moléculas de disolvente, de iones THA, lo que confirma la interpretación de que el THA actúa en cierto modo como matriz en las condiciones de LDI.

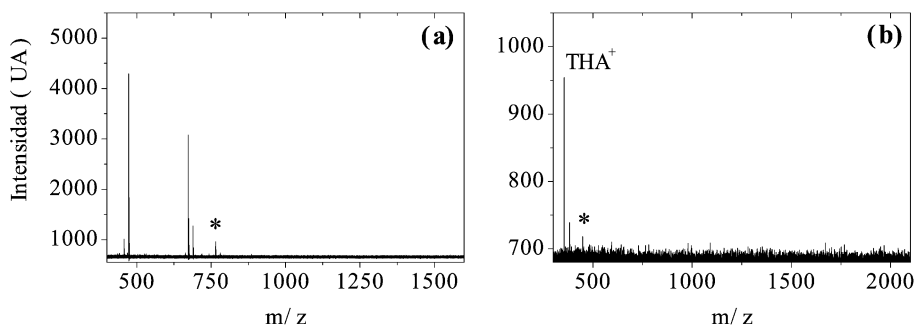


Figura 87. Espectros de masas LDI de la muestra de clústeres de oro, cuatro deposiciones y dos lavados: **(a)** negativo y **(b)** positivo.

Tabla 27. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en LDI negativo, con cuatro deposiciones y dos lavados. **Tol** tolueno, **THA** tetrahexilamonio.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
717.19	717.23	$[\text{Au}_2\text{THA Cl}(\text{H}_3\text{O})]^-$
765.15	765.35	$[\text{Au}_2\text{THAOH}]^-$
781.14	781.15	$[\text{Au}_2\text{Na} (\text{OH})_2 \text{Tol}_3(\text{H}_2\text{O})_3]^-$

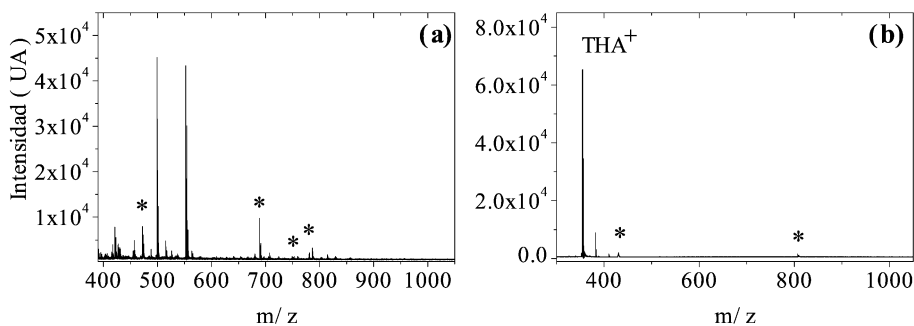
Tabla 28. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en LDI positivo, cuatro deposiciones y dos lavados.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
448.39	447.96	$[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Por otra parte, se usó la matriz DCTB para la medida del espectro de masas MALDI de los clústeres de oro. La matriz hace que el proceso de ionización con el láser sea más suave, por lo se usó para poder descartar la presencia de clústeres formados in situ a partir de los clústeres presentes en la muestra. Se probaron distintas proporciones muestra:matriz (1:1 y 1:10 en volumen), además de probar a hacer lavados con agua.

Aunque no se sabe la concentración exacta de clústeres de oro en la muestra, la cantidad máxima de oro que hay en la fase orgánica es 17 mM, calculada según los reactivos de partida. Se preparó una disolución de la matriz 43 mM en acetonitrilo y se hicieron mezclas muestra:matriz 1:1 y 1:10 (en volumen de disolución de ambas).

En la figura 88 se pueden ver los espectros de masas MALDI negativo (izquierda) y positivo (derecha) con una deposición muestra:matriz 1:1.

**Figura 88.** Espectros de masas MALDI de la muestra de clústeres oro con DCTB (proporción muestra: matriz 1:1 en vol): (a) negativo y (b) positivo.

En negativo se observaron clústeres Au_2 , Au_3 y Au_4 , con Au_2 en mucha mayor proporción; mientras que en positivo tan sólo clústeres de Au_2 y en una proporción mucho más pequeña respecto al pico de THA.

Aunque en el espectro negativo predominan los picos debidos a aductos de la matriz, los picos de los clústeres tienen una intensidad mucho mayor que en el caso de LDI. Al igual que ocurría en LDI el espectro positivo se ve dominado por el ión THA.

Como aparece reflejado en la asignación realizada para el espectro negativo de MALDI en la tabla 29, al usar la matriz DCTB hay un clúster que aparece asociado a una molécula de la matriz, el resto se ven coordinados por aniones cloruro, perclorato y sulfato, además de moléculas de agua.

Sin embargo en positivo aparecen asociados con moléculas de agua y cationes THA (tabla 30).

Tabla 29. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en MALDI, con DCTB, negativo (muestra:matriz 1:1 en vol). **Tol** tolueno, **DCTB** matriz.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
473.61	473.39	$[\text{Au}_4\text{NaCl}(\text{ClO}_4)]^{2-}$
689.17	689.07	$[\text{Au}_2\text{Cl}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{CN})\text{Tol}_2(\text{H}_2\text{O})]^-$
753.08	752.89	$[\text{Au}_3\text{NaCl}(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^-$
781.06	781.03	$[\text{Au}_2\text{Na SO}_4\text{DCTBH}_2\text{O}]^-$

Tabla 30. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en MALDI con DCTB positivo (muestra:matriz 1:1 en vol). **THA** tetrahexilamonio.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
430.30	429.95	$[\text{Au}_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$
807.28	807.30	$[\text{Au}_2\text{NaClTHAH}]^+$

Al contrario de lo esperado, con el uso de la matriz en el espectro no se observó la presencia de los clústeres de mayor tamaño, únicamente aparecieron picos correspondientes a clústeres de pequeño tamaño, esta vez de tres y cuatro átomos de oro, además del clúster de Au_2 . Esta distinta composición de la muestra con ambas técnicas (LDI y MALDI) parece indicar

que efectivamente existe un proceso de formación de clústeres de mayor tamaño a partir de los clústeres de dos, tres y cuatro átomos de oro presentes en la muestra cuando no se usa una matriz que evite esto.

Al hacer un lavado sobre la deposición de la mezcla muestra:matriz, el espectro negativo mejoró notablemente. Como se puede ver en la figura 89, el número de picos asociados a clústeres aumenta, y además de clústeres de Au_2 , Au_3 y Au_4 , se resuelve un clúster de Au_5 . De todas formas el pico de mayor intensidad en el espectro sigue siendo debido a la sal de THA. En estas condiciones no aparece ningún clúster en el espectro positivo.

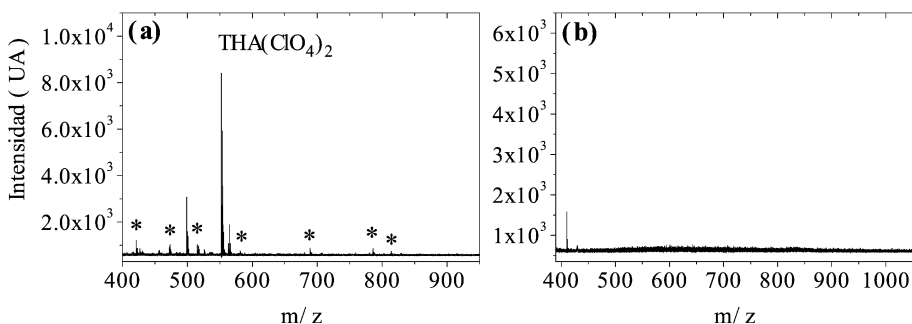


Figura 89. Espectros de masas MALDI de la muestra de clústeres oro con DCTB como matriz y un lavado con agua (proporción muestra:matriz 1:1 en vol): **(a)** negativo y **(b)** positivo.

Al igual que ocurría en los casos anteriores, en las asignaciones de la tabla 31 se puede ver como los clústeres aparecen rodeados de moléculas de matriz y disolvente (tolueno, acetonitrilo y agua), así como aniones cloruro y perclorato. La novedad está en el clúster de 803.02 uma que aparece con borohidruro procedente del NaBH_4 usado como reductor en la síntesis.

Siguen detectándose los mismos clústeres de dos, tres y cuatro átomos, por lo que el usar la matriz hace la medida más reproducible y menos dependiente de las condiciones que en el caso del LDI. Además, mediante el lavado de la muestra se consigue mejorar la resolución de la medida y favorecer la ionización de los clústeres.

Tabla 31. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en MALDI, con DCTB, negativo (muestra:matriz 1:1 vol, un lavado con agua). **DCTB** matriz, **Tol** tolueno.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
426.85	426.93	$[\text{Au}_2\text{O}_2\text{H}]^-$
473.37	473.39	$[\text{Au}_4\text{Na Cl}(\text{ClO}_4)]^{2-}$
515.04	516.88	$[\text{Au}_4\text{Na}_2(\text{ClO}_4)_2]^{2-}$
580.96	580.90	$[\text{Au}_5\text{ClClO}_4(\text{CH}_3\text{CN})]^{2-}$
679.87	679.94	$[\text{Au}_3(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_4]^-$
689.85	689.85	$[\text{Au}_3\text{ClO}_4]^-$
759.09	759.13	$[\text{Au}_2\text{NaDCTBTol}]^-$
786.10	786.21	$[\text{Au}_2(\text{CH}_3\text{CN})\text{Tol}_3(\text{H}_2\text{O})_4]^-$
803.02	802.91	$[\text{Au}_4\text{BH}_4]^-$
814.08	814.01	$[\text{Au}_3\text{NaOTol}]^-$
829.08	829.06	$[\text{Au}_3\text{Tol}_2(\text{H}_2\text{O})_3]^-$
858.21	858.05	$[\text{Au}_3(\text{OH})\text{DCTB}]^-$

Además de ser importante la forma de preparación y deposición de la matriz, también lo es la proporción de matriz y muestra que se usa para depositar en la placa de medida, por eso a continuación se realizaron las medidas utilizando una proporción muestra:matriz 10:1.

En la figura 90 se pueden ver los espectros obtenidos. En el caso del positivo, al igual que anteriormente, no aparece ningún clúster y el espectro se ve dominado por el pico del THA. En el caso del espectro negativo la cantidad de clústeres y su resolución es mejor que utilizando una relación de muestra:matriz 1:1, sin embargo, el espectro se ve dominado por picos debidos a la matriz. En la figura 93 aparece representado el espectro a partir de 600 uma con el fin de poder observar los clústeres más fácilmente.

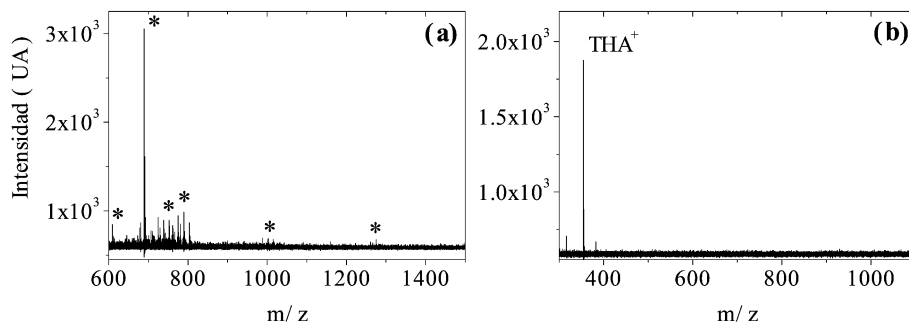


Figura 90. Espectros de masas MALDI de la muestra de clústeres oro con DCTB como matriz (proporción muestra:matriz 1:10 en vol): **(a)** negativo y **(b)** positivo.

En este caso, además de los clústeres de Au_2 , Au_3 y Au_4 , aparecen también clústeres de Au_6 y Au_7 , sin embargo está ausente el clúster de Au_5 . Los clústeres asociados con moléculas de disolvente y matriz aparecen recogidas en la tabla 32. El pico mas intenso, con diferencia, es el debido al clúster Au_2 .

Normalmente la matriz suele añadirse en una concentración mucho más elevada que la muestra para conseguir que lleve a cabo más eficazmente su función. En este caso la muestra de clústeres está muy diluida, porque aunque la concentración máxima de oro sea 17 mM, la reacción no es totalmente eficaz y con la elaboración que se lleva a cabo de la fase orgánica, en que se encuentran disueltos los clústeres de oro, se eliminan la mayor parte del oro que pueda haber quedado sin reducir. Debido a esta baja concentración es posible que sea necesaria una mayor proporción muestra:matriz para obtener mejores resultados. Sin embargo, el problema de esta mayor proporción es que los espectros negativos son mucho más complejos y difíciles de interpretar.

Se ha conseguido optimizar el método de medida para la obtención de los espectros con una mayor resolución. Ha quedado claro que es necesario el uso de una matriz que evite la formación de aductos a partir de los clústeres presentes en la muestra, para evitar una asignación incorrecta de la composición. Sin embargo, pese al uso del DCTB como matriz, existe una variabilidad en los datos obtenidos para las distintas condiciones de preparación de la muestra que puede ser debida a que las señales observadas sean debido a la fragmentación de clústeres más grandes. Por eso resultó

necesario el analizar la muestra mediante una técnica de ionización más suave que MALDI.

Tabla 32. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en MALDI con DCTB negativo (muestra:matriz 10:1 en vol). **THA** tetrahexilamonio, **DCTB** matriz, **Tol** tolueno.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
609.06	608.91	$[\text{Au}_3\text{H}_2\text{O}]^-$
680.33	680.10	$[\text{Au}_2\text{DCTB}(\text{H}_2\text{O})_2]^-$
689.30	689.04	$[\text{Au}_2\text{Na}(\text{OH})\text{Tol}(\text{H}_2\text{O})_2]^-$
706.36	706.04	$[\text{Au}_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_2\text{Tol}_2\text{Na}]^-$
724.35	724.15	$[\text{Au}_2\text{Tol}_3(\text{H}_2\text{O})_3]^-$
752.37	752.37	$[\text{Au}_7\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_3]^{2-}$
761.30	761.38	$[\text{Au}_7\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^{2-}$
766.38	766.08	$[\text{Au}_2\text{Cl}(\text{OH})_3\text{DCTB}(\text{H}_2\text{O})_2]^-$
773.33	773.02	$[\text{Au}_3\text{To}(\text{H}_2\text{O})_5\text{I}]^-$
781.21	781.02	$[\text{Au}_3(\text{CH}_3\text{CN})_2(\text{H}_2\text{O})_6]^-$
789.32	789.12	$[\text{Au}_2\text{ClDCTBTol}(\text{H}_2\text{O})]^-$
987.48	986.98	$[\text{Au}_4(\text{OH})\text{Tol}(\text{H}_2\text{O})_5]^-$
1002.50	1002.21	$[\text{Au}_2\text{Cl}(\text{O}_2)\text{DCTB}_2(\text{CH}_3\text{CN})]^-$
1015.50	1015.33	$[\text{Au}_3(\text{OH})_2\text{THA}(\text{H}_2\text{O})]^-$
1275.20	1275.82	$[\text{Au}_6\text{Na}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]^-$

4.3 ESI

Como ya se comentó se usaron dos aparatos distintos de ESI para el análisis de la muestra. El primero un QqTOF, que consta de dos analizadores en tándem

(cuadrupolo y de tiempo de vuelo) y el segundo un LTQ-Orbitrap, que consta de una doble trampa de iones.

Inicialmente se ensayó la identificación mediante QqTOF. Este aparato al contar con dos analizadores situados en serie, permite la utilización de ambos o bien sólo uno de ellos. Al igual que se había hecho para la técnica de MALDI se hicieron medidas del blanco en las distintas condiciones para poder asignar claramente los picos de la muestra. En primer lugar se usaron los dos analizadores, el de cuadrupolo y el de tiempo de vuelo en modo positivo y negativo, sin embargo sólo se observaron picos nuevos con respecto al blanco en el caso del espectro positivo (figura 91). En la tabla 33 aparecen las asignaciones de estos picos, que se ajustaron a clústeres de Au_2 y Au_4 teniendo en cuenta su distribución isotópica, igual que se hizo con MALDI.

El pico debido al clúster de Au_4 tiene mucha menos intensidad que el clúster Au_2 , una ampliación de ambos picos se puede ver en la figura 92.

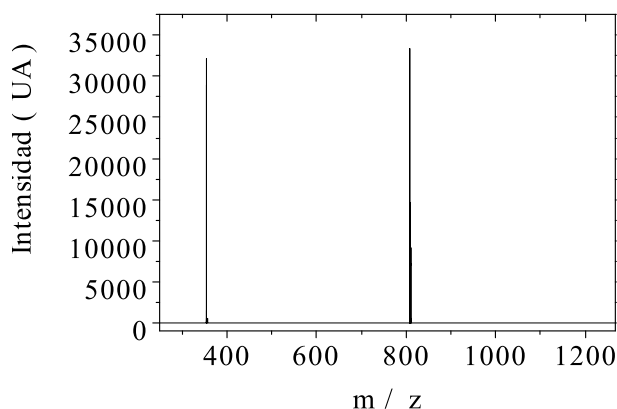


Figura 91. Espectro de masas ESI-QqTOF positivo de la muestra de clústeres de oro.

Tabla 33. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en ESI-QqTOF positivo. **THA** tetrahexilamonio.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
807.77	807.35	$[\text{Au}_2\text{NaTHA}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$
1261.14	1260.24	$[\text{Au}_4\text{THAClO}_4(\text{H}_3\text{O})]^+$

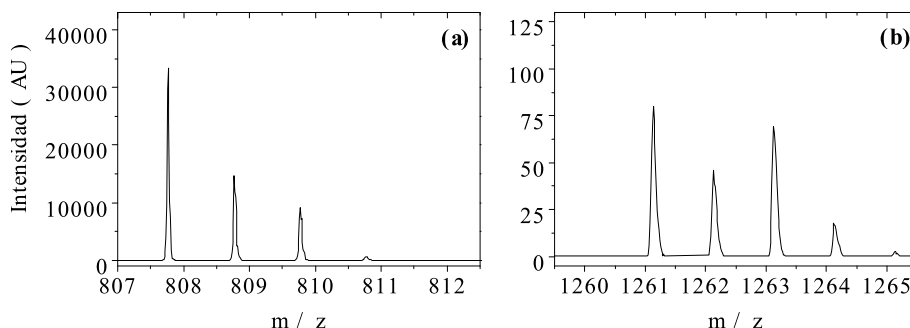


Figura 92. Espectro de masas ESI-QqTOF positivo de la muestra de clústeres de oro. Detalle de los picos de clústeres: **(a)** 807.77 uma y **(b)** 1261.14 uma.

El pico a 807 uma aparece también en el blanco, aunque a una intensidad mucho más baja, por lo que podemos considerar que se trata de un clúster de Au_2 presente en la muestra y no generado en el aparato de medida a partir de los iones sin reducir, ya que en el caso del blanco la concentración de cationes de oro es la máxima en las condiciones de síntesis y mucho mayor que en el caso de la muestra de clústeres de oro.

Un aspecto importante a considerar en la técnica de ESI es la conductividad del disolvente. Esta ha de ser suficientemente alta para que las gotas del espetroespray se carguen, de modo que se produzca una “explosión coulombica” que origine gotas cada vez más pequeñas y que permita, al final, obtener las especies a analizar lo más aisladas posible. Por ello en las primeras medidas con el analizador QqTOF se diluyó la muestra con tolueno en una proporción 1:50 en volumen. Además se realizaron experimentos diluyendo con acetonitrilo 1:100. La comparativa de los resultados obtenidos en ambos casos indicaron que usando acetonitrilo se consigue una mayor resolución.

Uno de los inconvenientes del analizador de tiempo de vuelo (TOF) es que en la rejilla del “reflectron” (espejo que se usa para reflejar los iones antes de llegar al detector) se pueden perder las especies con energías cinéticas mayores ya que éstas penetran más profundamente y podrían no ser reflejadas hacia el detector. Puesto que la energía cinética es mayor cuanto mayor es la masa de la especie, podrían existir en disolución clústeres de mayor tamaño que los detectados. Por ello se decidió analizar la misma muestra, en idénticas condiciones, aunque dirigiendo la muestra directamente desde la trampa

iónica (cuadrupolo) hacia el detector. Estas medidas se hicieron a sabiendas de que los datos serían meramente indicativos de la presencia de otras especies, en caso de haberlas, aunque sin resolución suficiente para un análisis riguroso de los espectros. La baja resolución obtenida es debida a que el equipo no está propiamente diseñado para trabajar en modo ESI-Q sino ESI-QqTOF.

Los resultados obtenidos en el espectro positivo concordaron bien con los observados para ESI-QqTOF. Así, se observaron claramente los picos a 807 y 1261 uma. Además se observaron, aunque con muy baja intensidad otros picos a 1428, 1471, 1634, 1715, 1946 y 2050. Este último grupo de picos podría corresponder a clústeres con masas más altas y en concentraciones más bajas que los detectados con ESI-QqTOF de iones positivos. Con respecto al espectro de iones negativos se observaron picos más intensos a 552 y 1005 umas. Además, con baja intensidad a 413, 408 y 721 uma. La coincidencia de los picos más importantes observados en ESI-QqTOF y ESI-Q indica que las medidas en este último caso son correctas. Por otra parte los picos adicionales encontrados empleando esta última técnica, avalan la hipótesis de que pueden existir otras especies en disolución no detectadas con el analizador QqTOF. Cabe decir que en modo negativo los resultados de la muestra y del blanco son muy similares, contrariamente a lo que ocurre en modo positivo.

El empleo de otro equipo como el Orbitrap, supone un cambio cualitativo del analizador de masas, ya que en general proporciona una mayor resolución de la medida con una mínima fragmentación. Aunque el aparato se encuentra acoplado a un HPLC, las medidas finales se llevaron a cabo por infusión directa en el ionizador, porque las pruebas realizadas pasando la muestra por la columna de C18 del cromatógrafo dieron como resultado cromatogramas muy sucios.

Para la infusión directa de la muestra se llevó a cabo su dilución con acetonitrilo, para evitar posibles interferencias con la sal de THA. Se probaron varias diluciones y se encontró que la mejor correspondía a diluir 1 ml de la muestra de clústeres de oro en 10 ml de acetonitrilo. En estas condiciones, al igual que ocurría con MALDI, en el espectro positivo sólo se observaron picos debidos al blanco, sobre todo a la sal de THA. Sin embargo, en el espectro negativo se observaron varios picos inequívocamente debidos a clústeres de oro. Tras descartar aquellos que también aparecen en el blanco o aquellos que

por ser muy poco intensos pueden confundirse con el ruido, se asignaron picos debidos a clústeres Au_4 , Au_6 y Au_8 . También se observaron tres series de picos espaciadas entre sí por 100 uma que se asignaron a la presencia de clústeres Au_6 y Au_4 . La masa creciente de 100 unidades se asoció con la ganancia sucesiva de dos moléculas de acetonitrilo y una molécula de agua.

En la figura 93 está representado el espectro negativo ampliado, el pico más intenso que se puede ver corresponde a moléculas de THA con iones cloruro. En la tabla 34 se puede ver la asignación de todos los clústeres y el primer pico de cada una de las series. Se observó, al igual que con las otras técnicas, la tendencia de los clústeres a asociarse con moléculas de disolvente como el tolueno, acetonitrilo y agua. Mediante esta técnica de ionización, la más suave de todas las probadas, se ha llegado a una composición de la muestra de clústeres de Au_4 , Au_5 , Au_6 y Au_8 . Como había quedado patente en las pruebas hechas con el ESI-Q la muestra está formada por clústeres de mayor tamaño. Además, el que con la técnica más suave se haya obtenido una composición de clústeres más grandes, en la que no se detectó la presencia del clúster de Au_2 , parece indicar que en realidad mediante MALDI y ESI-QqTOF se produce la fragmentación de los clústeres, que lleva a que mayoritariamente se observara la señal del clúster de dos átomos de oro.

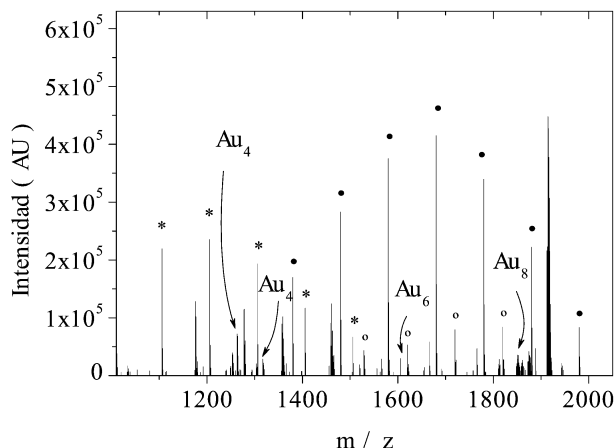


Figura 93. Espectro de masas ESI-LTQ-OrbiTrap negativo de la muestra de clústeres de oro. Voltaje del cono -48,94 V. Asignación series: Au_4 (*), Au_6 (● y ○).

Tabla 34. Masas calculadas y experimentales de clústeres de oro encontrados en ESI-LTQ-Orbitrap negativo. **Tol** tolueno.

Masa encontrada	Masa calculada	Asignación
1105.97 (*)	1106.06	$[\text{Au}_4\text{Na}(\text{H}_3\text{O})\text{Tol}_3]^-$
1239.15	1239.15	$[\text{Au}_4(\text{OH})(\text{CH}_3\text{CN})_3\text{Tol}_3(\text{H}_2\text{O})_2]^-$
1253.17	1253.12	$[\text{Au}_4\text{Cl}(\text{CH}_3\text{CN})_6\text{Tol}_2]^-$
1263.19	1263.17	$[\text{Au}_4(\text{OH})(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{Tol}_3(\text{H}_2\text{O})]^-$
1265.98	1265.98	$[\text{Au}_5\text{Na}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{CN})_5(\text{H}_2\text{O})_2]^-$
1317.15	1317.16	$[\text{Au}_4\text{ClTol}_4(\text{H}_2\text{O})_7]^-$
1379.99 (●)	1379.90	$[\text{Au}_6\text{O}(\text{Tol-H})_2]^-$
1419.95 (○)	1419.91	$[\text{Au}_6(\text{H}_3\text{O})\text{ClTol}_2]^-$
1605.94	1606.04	$[\text{Au}_6\text{Na}(\text{OH})\text{Tol}_3(\text{H}_2\text{O})_6]^-$
1865.95	1865.90	$[\text{Au}_8(\text{OH})_2\text{Tol}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^-$

4.4 Conclusiones

Se han ensayado varias técnicas de espectrometría de masas para la caracterización de una muestra de clústeres de oro.

Inicialmente se probó la técnica de MALDI-TOF para la medida de la muestra. Aunque se consiguieron optimizar las condiciones de medida y se observaron picos claramente asociados a clústeres de oro se observó la formación de aductos de clústeres de pequeño tamaño para dar lugar a señales de clústeres de un tamaño mayor. Además la medida mediante esta técnica no proporcionó la composición de la muestra de forma inequívoca, porque se observaron variaciones en los espectros al variar la forma de deposición de la muestra.

Debido a estos resultados, a continuación se usó la técnica de ionización por electrospray (ESI), probando con dos analizadores distintos: QqTOF y Orbitrap. Estas técnicas resultaron más suaves a la hora de ionizar la muestra,

sin embargo, tampoco proporcionaron los mismos resultados. Por una parte según el espectro de masas obtenido por ESI-QqTOF la muestra estaría compuesta por clústeres de Au_2 y Au_4 , mientras que el espectro obtenido por ESI-Orbitrap presentó señales correspondientes a clústeres de Au_4 , Au_5 , Au_6 y Au_8 . Si se tiene en cuenta que esta última técnica (Orbitrap) es más sensible y más suave que la QqTOF, se puede deducir que los clústeres de dos átomos de oro observados tanto por MALDI como por ESI-QqTOF serían producto de la fragmentación de los clústeres de cuatro, cinco, seis y ocho átomos presentes en la muestra.

Ha sido la primera vez, hasta donde nosotros sabemos, que la técnica de EM ESI-Orbitrap se ha usado para la caracterización de clústeres de tan pequeño tamaño y los resultados obtenidos en este trabajo muestran como resulta mucho más adecuada para este fin que la de MALDI o incluso ESI. A raíz de los buenos resultados obtenidos, expuestos en este trabajo, se extenderá la caracterización por EM ESI-LTQ-Orbitrap a muestras de clústeres de otros metales.

5

Funcionalización de clústeres de cobalto

El desarrollo de moléculas adecuadas para la funcionalización de nanopartículas y clústeres metálicos es un campo donde se funden la nanotecnología y la química orgánica. Dentro de este campo de aplicación las nanopartículas y clústeres magnéticos se han perfilado como los más prometedores. Su pequeño tamaño les permite actuar a nivel celular y por otra parte el dominio magnético macroscópico normal se transforma en un estado monodominio, permitiendo su aplicación en una gran variedad de campos. Más concretamente, dentro del campo de la biomedicina se han usado con éxito como agentes de contraste en MRI,^{xii} liberación controlada de fármacos e hipertermia de células tumorales.¹¹⁸⁻¹²⁰

Para la aplicación de clústeres magnéticos in vivo son importantes tanto las características de los clústeres como el recubrimiento de los mismos. Hay que conseguir, por una parte, que el clúster tenga las propiedades magnéticas adecuadas para realizar la tarea que se pretende (ya sea poder ser dirigidas a las células diana o generar calor mediante la aplicación de un campo magnético externo) y por otra parte tiene que facilitarse el anclaje del fármaco de interés y todo esto evitando que el cuerpo los elimine antes de cumplir su objetivo, para lo que han de ser totalmente biocompatibles. En este sentido es

^{xii} MRI (magnetic resonance imaging): Técnica no invasiva para la visualización detallada de estructuras de interés dentro del cuerpo humano haciendo uso de la resonancia magnética nuclear para observar núcleos. Es especialmente interesante su uso en medicina para la observación de alteraciones en tejidos para la detección del cáncer y otras patologías.

importante que los clústeres sean suficientemente pequeños para evitar el sistema mononuclear fagocítico y suficientemente grandes para evitar ser eliminadas a través de los riñones.^{xiii}

El recubrimiento orgánico tiene que estabilizar el sistema coloidal durante todos los pasos, desde la síntesis hasta la aplicación final en las células diana. Es importante que el enlace entre el clúster y el ligando sea fuerte para evitar el equilibrio dinámico con los ligandos libres en disolución y que por tanto pueda perderse la estabilidad o la funcionalidad deseada. Han sido muy usados con estos propósitos diferentes polímeros, tanto naturales como sintéticos, debido a su gran versatilidad y biocompatibilidad. Además, en el caso de pretender el anclaje de algún fármaco o molécula es imprescindible que cuente con algún grupo funcional que permita esto.

En lo tocante a los clústeres o nanopartículas los materiales más comunes son óxidos de hierro, sin embargo el cobalto se empieza a perfilar como un buen candidato ya que tiene la ventaja intrínseca de su alta temperatura de saturación de magnetización, lo que lo hace más adecuado para su aplicación en MRI, ya que permite el uso nanopartículas de menor tamaño sin comprometer su sensibilidad. Una de las grandes desventajas del cobalto es su toxicidad, aunque esta podría modularse mediante el recubrimiento adecuado.

Son muchos los métodos de síntesis de nanopartículas y clústeres de cobalto que se pueden encontrar en la bibliografía, en general están basados en la descomposición térmica o la reducción química a alta temperatura de algún precursor organometálico de cobalto en presencia de un agente protector.

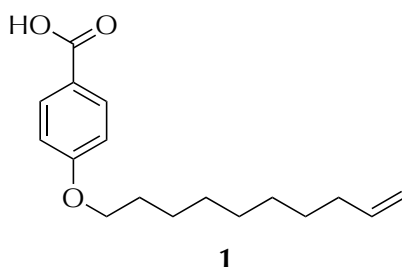
En este sentido, por ejemplo, se han obtenido nanopartículas de cobalto recubiertas con óxido de trioctilfosfina y ácido oleico mediante la descomposición térmica de $\text{Co}_2(\text{CO})_8$.^{121, 122} Otro precursor usado con este fin es el cloruro de cobalto (CoCl_2), con el que Sun *et al.* sintetizaron nanopartículas de 2 a 11 nm mediante su reducción con superhidruro (LiBEt_3H) en presencia de ácido oleico y trialquilfosfina.¹²³ La presencia del

^{xiii} Sistema mononuclear fagocítico (SMF), anteriormente conocido como RES (sistema reticuloendotelial): es la parte del sistema inmunitario consistente en las células fagocíticas cuyas funciones son, entre otras, atacar y destruir agentes infecciosos o partículas invasoras del cuerpo humano.

ácido oleico y la tetraalquilfosfina es importante, no sólo para controlar el crecimiento de las partículas durante el proceso de síntesis, si no también para protegerlas y prevenir su oxidación.

Como ya se ha visto en el capítulo 1, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un método de síntesis de nanopartículas y clústeres grandes (del orden de cientos de átomos del metal por clúster) de distintos metales, basado en la síntesis electroquímica propuesta por Reetz *et al*,^{47, 124} en el que se consigue el control del tamaño de los clústeres obtenidos mediante el control del potencial aplicado durante la síntesis.^{38, 39, 125} Esta síntesis se basa en la disolución anódica de un ánodo de cobalto en presencia de una sal de tetraalquilamonio, que además de funcionar como estabilizante, actúa como electrolito soporte. Tras la síntesis los clústeres se protegen con una mezcla de trifenilfosfina y ácido oleico, logrando así la obtención de clústeres de cobalto estables frente a la oxidación y con un tamaño definido.

En este trabajo se propone la sustitución del ácido oleico por un ácido carboxílico modificado con una funcionalidad que permita el posterior anclaje de cualquier molécula de interés dentro de su aplicación en biomedicina. Así que se pensó en el ácido 4-(dec-9-eniloxy)benzoico (ADCB) (figura 94), que tiene por una parte un ácido carboxílico apropiado para la unión con clústeres de cobalto y por otra parte, un doble enlace, un grupo funcional muy versátil en química orgánica.



ácido 4-(dec-9-eniloxy)benzoico

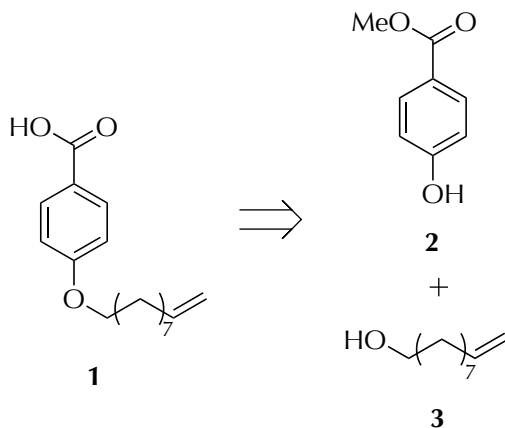
ADCB

Figura 94. Estructura del ligando **1** propuesto.

5.1 Análisis retrosintético y síntesis del ligando 1

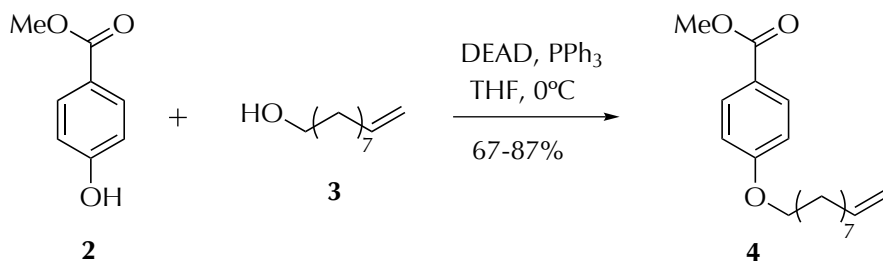
El ligando **1** (ADCB) se obtendría a partir del 4-hidroxibenzoato de metilo (**2**) y el dec-9-enol mediante la reacción de Mitsunobu,¹²⁶ una de las reacciones más comunes para la síntesis de aril-éteres, seguido de la hidrólisis del éster.

Esquema 8. Análisis retrosintético del compuesto **1**, ADCB.



Se llevó a cabo la reacción del alcohol **3** con el fenol **2** en las condiciones de reacción descritas por Mitsunobu en 1981,¹²⁷ utilizando azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifenilfosfina en THF, a 0°C, durante 12 horas. Los rendimientos para la obtención del compuesto deseado **4** fueron del 67% al 87% (esquema 9), y entran dentro de los observados en la bibliografía para la alquilación de fenoles, que van desde un 52% hasta un 98%.

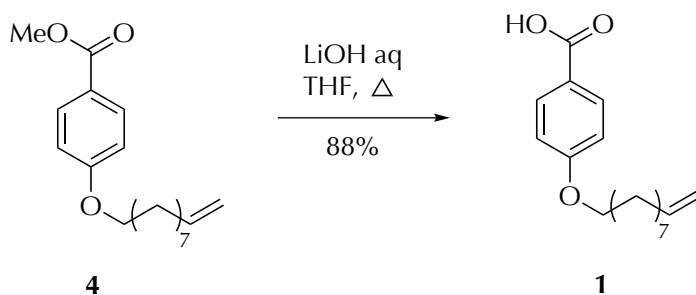
Esquema 9. Síntesis del aril-éter **4**.



El éster **4** se caracterizó mediante ^1H y ^{13}C -RMN, siendo las señales más características en el espectro de ^1H -RMN las correspondientes a los cuatro protones aromáticos (6.88 y 7.96 ppm) y las correspondientes a los tres protones alquenílicos (5.80 y 4.97 ppm).

El siguiente paso de la ruta sintética fue la hidrólisis del éster **4**. Esta reacción se llevó a cabo mediante catálisis básica con hidróxido de litio en $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ a reflujo, obteniéndose el ácido **1** con un 88% de rendimiento (esquema 10).

Esquema 10. Síntesis del compuesto final **1**.



En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **1** se observó la desaparición de la señal del grupo metilo del éster.

5.2 Síntesis de clústeres de cobalto

Los clústeres de cobalto se sintetizaron mediante el método desarrollado en nuestro laboratorio y en las condiciones de Ana Ledo *et al.* para la obtención de clústeres de 2 nm.¹²⁵ Se usó un potenciostato Autolab PGSTAT 20, la temperatura se mantuvo termostatizada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y todos los potenciales se midieron contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl . Como electrodo de trabajo (cátodo) se usó una lámina de platino que se situó enfrentada a una lámina de cobalto de la misma superficie, actuando como contraelectrodo (ánodo).

Antes de realizar la síntesis se limpiaron ambos electrodos, el de platino mecánicamente mediante un pulido a mano con polvo de alúmina y electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica en una disolución de ácido sulfúrico 1 M, mientras que el de cobalto se limpió únicamente

mediante un pulido mecánico en las mismas condiciones. La disolución electrolítica consistió en una disolución 0.1 M de nitrato de tetrabutilamonio en acetonitrilo previamente desgasificada y que se mantuvo en atmósfera inerte de nitrógeno durante todo el proceso. Se aplicó una densidad de corriente de $5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 5400 s. En la figura 95 se puede ver la evolución del potencial durante el proceso.

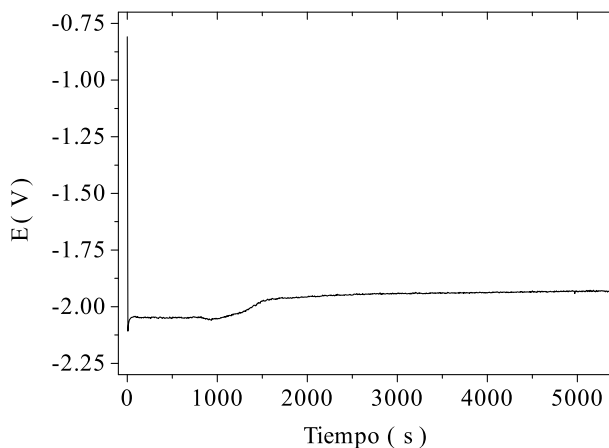


Figura 95. Evolución del potencial del electrodo durante la síntesis de nanopartículas de cobalto.

La evolución es la esperada para la formación de clústeres en estas condiciones, inicialmente se produce un aumento muy pronunciado del potencial asociado al incremento de la concentración de cationes de Co^{2+} en disolución. Esto además se corrobora con la aparición de una coloración rosada en el medio de síntesis a momentos iniciales, que se corresponde con la formación del complejo de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ que desaparece a medida que se van formando los clústeres de cobalto por reducción del complejo en el cátodo. Cuando los clústeres en el medio tienen una concentración elevada se observa su precipitación como un sólido marrón en el fondo de la celda electrolítica.

Después de 5400 s de síntesis los clústeres se trasvasaron a un matraz con atmósfera inerte mediante una bomba peristáltica para evitar que se oxidaran al contacto con el aire.

5.3 Acoplamiento de los clústeres de cobalto con el ADCB

Para mantener la atmósfera inerte durante todo el proceso se trabajó en caja seca. El sólido marrón obtenido en la etapa anterior se lavó varias veces con acetonitrilo, eliminando por decantación la mayor cantidad de disolvente posible. A continuación se añadió una disolución de ADCB en acetato de etilo. Tras añadir el agente protector los clústeres de cobalto se dispersaron parcialmente en este disolvente, lo que constituyó un primer indicio de la unión del ADCB a las partículas. Se hizo un estudio de la solubilidad de las partículas estabilizadas con ADCB en disolventes de diferente polaridad, encontrando que eran totalmente insolubles en éter etílico, hexano y dimetil-sulfóxido y parcialmente solubles en dimetilformamida, diclorometano, tetrahidrofurano, etanol e isobutanol.

Los clústeres de cobalto funcionalizados con ADCB se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja (figura 96).

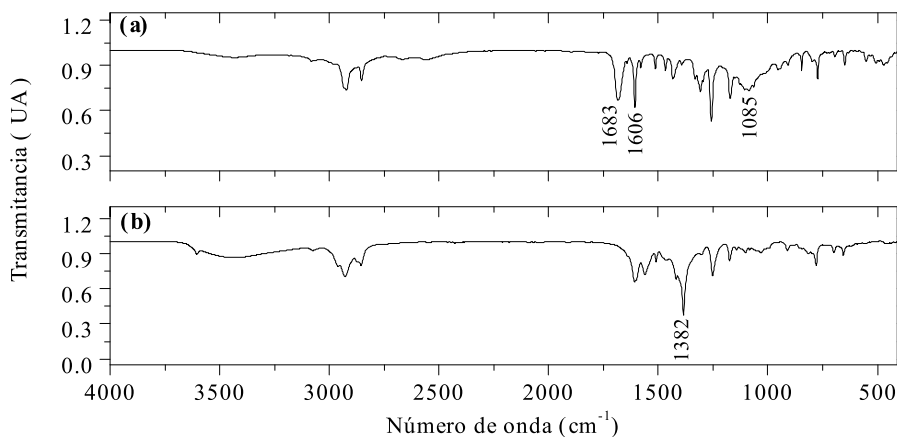


Figura 96. Espectro IR de: **(a)** ADCB puro y **(b)** clústeres de cobalto recubiertos con ADCB, con los picos más representativos señalados sobre el espectro.

El espectro se comparó con el del ácido **1** puro, utilizando los dos modos de vibración del grupo ácido para hacer una evaluación de la coordinación. En la tabla 35 aparece la asignación de las bandas más relevantes del ADCB, así

como el desplazamiento que sufren al coordinarse con los clústeres de cobalto.¹²⁸⁻¹³³

Tabla 35. Asignación de las bandas del espectro IR del ADCB puro y unido a los clústeres de cobalto. **st** vibración de tensión, **def** vibración de deformación, **s** simétrica, **a** asimétrica, **ip** en el plano.

ADCB		ADCBCo	
Número de onda/ cm ⁻¹	Vibración	Número de onda/ cm ⁻¹	Vibración
3082	C-H st (anillo) =CH ₂ st	3078	C-H st (anillo) =CH ₂ st
2919	CH ₂ a st	2925	CH ₂ a st
2852	CH ₂ s st	2854	CH ₂ s st
1683	O-C-O a st	—	—
1606	O-C-O s st	—	—
1577	anillo st	1558	anillo st
1513	C-H def	1510	C-H def
1467	anillo st	1465	anillo st
1432	O-H def ip	—	—
1394	C-C st (anillo) C-H def	—	—
—	—	1382	O-C-O st
1085	C-O st	—	—

En general, las bandas cambian con la coordinación y se desplazan. Cabe destacar dos tendencias distintas, en el caso de las vibraciones de tensión de los grupos CH₂ de la cadena alifática estas se desplazan a números de onda mayores, mientras que las vibraciones debidas al anillo aromático se desplazan a números de onda menores. Este desplazamiento puede relacionarse con la acción del campo de la superficie sólida al estar el ADCB coordinado a los clústeres de cobalto.¹²⁹

La diferencia más relevante entre los dos espectros se debe a la coordinación del grupo ácido del ADCB sobre la superficie de los clústeres de cobalto, que se refleja en la ausencia de los modos de vibración de tensión simétrica y asimétrica del grupo COOH a 1683 y 1606 cm^{-1} y la aparición de una nueva banda muy intensa a 1382 cm^{-1} , que indica una coordinación simétrica del grupo ácido sobre la superficie de los clústeres.¹²⁸

Para calcular el número de moléculas de ADCB que se encuentran coordinadas a cada partícula se llevó a cabo un análisis termogravimétrico tanto de los clústeres protegidos con ADCB como del compuesto puro (figura 97).

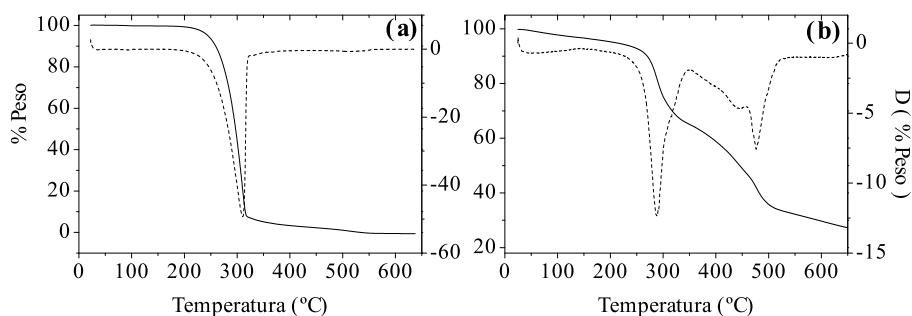


Figura 97. Análisis termogravimétrico de: **(a)** ADCB puro y **(b)** unido a los clústeres de cobalto. En ambos casos se ha representado también la derivada (---).

En el termograma de los clústeres de cobalto se pueden ver cuatro pendientes distintas (tabla 36).

Inicialmente se produciría la pérdida del disolvente ocluido en la muestra sólida que se introduce en la balanza, a continuación se evaporarían las moléculas de ADCB que hay libres en la muestra y seguidamente, a una temperatura un poco mayor se produciría la evaporación de las moléculas de ADCB unidas al cobalto. En este caso la temperatura de evaporación sería un poco mayor ya que hay que vencer la energía de enlace del ADCB con el cobalto. En esta pendiente cabe destacar que se observan dos temperaturas distintas, probablemente debidas a la presencia de moléculas unidas mediante dos tipos de coordinación distintas. Finalmente se observa la evaporación de impurezas presentes en la muestra y la masa que quedaría sin evaporar correspondería con el cobalto.

Tabla 36. Asignación de las pendientes observadas en el TGA de la muestra.

Temperatura/°C	% Peso	Masa/mg	Asignación
24-258	8.3	0.45	disolvente
288	22.45	1.18	ADCB libre
443 y 476	34.28	1.8	ADCB unido
500-700	9.04	0.48	impurezas
≥700	26	1.37	cobalto
Total	100.07	5.28	

Suponiendo una distribución uniforme de nanopartículas de 2 nm con los datos obtenidos mediante TGA se llega a una fórmula para el compuesto sintetizado de: $\text{Co}_{381}\text{ADCB}_{103}$.^{xiv}

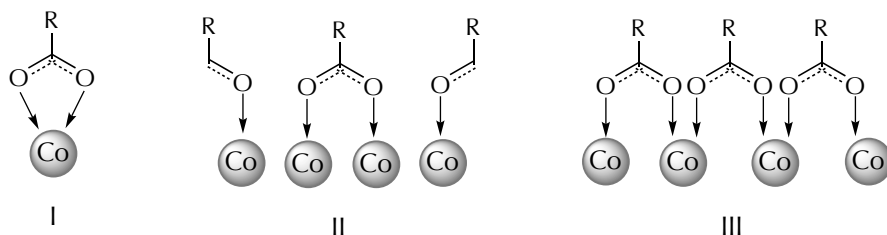


Figura 98. Tipos de unión de un grupo ácido a los átomos de cobalto de la superficie de un clúster grande, bidentado quelato (I) y puente (II y III).

^{xiv} Por una parte se calcula el número de átomos de cobalto por clúster asumiendo una forma esférica y una estructura fcc uniforme, por medio de la fórmula:

$$N = \frac{\pi}{6} \frac{\rho D^3}{M} N_A = 381$$

donde N es el número de átomos por nanopartícula, ρ es la densidad del cobalto fcc 8.9 g/cm^3 , D es el diámetro de la partícula $2 \times 10^{-7} \text{ cm}$, M es el peso atómico del cobalto 58.93 g/mol y N_A el número de Avogadro 6.023×10^{23} átomos por mol.

Finalmente, teniendo en cuenta los porcentajes de cobalto y ADCB presentes en la muestra se calcula la proporción de moléculas de ADCB para 381 átomos de cobalto, llegando a la fórmula molecular descrita.

Si se tiene en cuenta que para un clúster de 381 átomos de cobalto el número de átomos superficiales ha de ser de 256,^{xv} se puede calcular que el número de moléculas de ADCB por átomo de cobalto de la superficie ha de ser de 0.4. Este número debería de ser uno para el caso en que cada átomo de cobalto estuviera unido a dos átomos de oxígeno del mismo ligando mediante un enlace bidentado quelato (figura 98, I) o bien de dos moléculas distintas mediante un enlace bidentado puente (figura 98, III); por otra parte sería 0.5 en el caso de que cada átomo de cobalto estuviera unido únicamente a un átomo de oxígeno mediante una unión bidentado puente (figura 98, II). Este resultado sugiere que algunos átomos de cobalto se encontrarían sin coordinar mientras que otros estarían coordinados mediante una unión tipo II.

Por último, se puede calcular también el tamaño que ocupa cada molécula en la superficie: 12.20 Å². Este área es menor que la ocupada por un ácido graso en estado sólido (18.5 Å²) o en una monocapa (20.5 Å²), por tanto se puede decir que las moléculas de ADCB se encuentran formando un empaquetamiento muy compacto en la superficie de los clústeres, quizás debido a interacciones de π -stacking entre los anillos aromáticos del ADCB, proporcionando a las nanopartículas de cobalto una buena protección frente a la oxidación y una baja solubilidad en la mayor parte de los disolventes orgánicos.

5.4 Conclusiones

En definitiva, se ha conseguido sintetizar el ácido 4-(dec-9-enilo)benzoico **1** en dos pasos y con un rendimiento global del 77%. Usando esta molécula como agente protector se han sintetizado clústeres grandes de cobalto de 2 nm mediante un método electroquímico.

Se ha podido verificar la coordinación del grupo ácido a la superficie de las partículas mediante espectroscopía IR y con el análisis termogravimétrico se

^{xv} A esta cifra se llega igualando el área superficial de la partícula con el área de la sección de un átomo de cobalto, $4\pi r_{Np}^2 = N\pi r_{at}^2$, donde **N** es el número de átomos superficiales, **r_{Np}** y **r_{at}** los radios del clúster y un átomo de cobalto respectivamente. Así

$$N = \frac{4r_{Np}^2}{r_{at}^2} = 256 \text{ átomos.}$$

ha llegado a una fórmula para el nuevo compuesto sintetizado de $\text{Co}_{381}\text{ADCB}_{103}$, lo que implica un empaquetamiento muy compacto de las moléculas del compuesto **1** sobre la superficie de los clústeres de cobalto.

El trabajo incluido en este capítulo se ha publicado en:

Rodríguez-Cobo, E.; Rivas J.; Blanco, M.C.; Mouriño, A.; Torneiro, M.; López-Quintela, M.A., Functionalization of atomic cobalt clusters obtained by electrochemical methods. *Phys. Status Solidi A* **2006**, 203 (6), 1223-1228.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Las reacciones electroquímicas, tanto en el caso de la síntesis de clústeres de oro como de cobalto, se llevaron a cabo en un potenciostato AUTOLAB PGSTAT20, usando una celda de vidrio convencional de un compartimento, bajo atmósfera inerte por burbujeo de nitrógeno, manteniendo agitación magnética y termostatizadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ con un termostato POLISCIENCE. Los electrodos usados en todos los casos (comprados a GOODFELLOW) se limpiaron mediante pulido mecánico con óxido de aluminio ($0.05\text{ }\mu\text{m}$ BUEHLER), seguido de una limpieza en baño de ultrasonidos (ELMA) en agua. En el caso de los electrodos de trabajo, además se realizó una voltamperometría cíclica en una disolución de ácido sulfúrico 1M, realizando barridos de 1.35 V a -0.15 V a una velocidad de 0.5 V/s hasta que se observaron los picos correspondientes a la formación del óxido y reducción del metal, así como la adsorción de hidrógeno.

Las reacciones químicas de síntesis de clústeres se llevaron a cabo al aire y a temperatura ambiente, manteniendo agitación magnética, salvo que se indique lo contrario.

Para las separaciones por HPLC se usó una bomba WATERS600 capaz de elución en gradiente, acoplado a dos detectores en serie, un detector de arreglo de fotodiodos 2998 PDA y uno de fluorescencia multi- λ 2475 ambos de WATERS. Las columnas analíticas usadas fueron de C18 y NH₂ con un tamaño de $4.6 \times 150\text{ mm}$, mientras que la columna preparativa fue de C18 y un tamaño de $21.2 \times 250\text{ mm}$, todas de PHENOMENEX modelo LUNA. Las muestras se prefiltraron mediante filtros de MILLIPORE ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) antes de su inyección y en todos los casos se acopló una precolumna antes de la columna del mismo relleno. La adquisición y tratamiento de los datos se llevó a cabo con el software EMPOWER de WATERS.

Para la caracterización de clústeres por espectrometría de masas MALDI se empleó un MALDI-TOF VOYAGER DESTRO de APPLIED BIOSYSTEMS (láser de

N₂ 337 nm). Las muestras fueron depositadas en disolución mediante distintas técnicas en un plato de acero inoxidable (100 posiciones). En los casos indicados se usó como matriz DCTB de ALDRICH. Para las medidas de ESI se emplearon dos aparatos distintos: LTQ-Orbitrap Accela de THERMO FISCHER SCI y LC-Q-q-TOF QSTAR ELITE de APPLIED BIOSYSTEMS, en los dos casos se realizó una dilución de la muestra en distintas proporciones con acetonitrilo o tolueno.

Las reacciones de moléculas orgánicas se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de argón, con agitación magnética y a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario. Para el aislamiento de los sólidos obtenidos se usó la concentración a vacío en un rotavapor BUCHI. Para el seguimiento de las reacciones se usó cromatografía en capa fina, empleando cromatofolios de gel de sílice de tipo 60 F₂₅₄ (Merck) sobre soporte de aluminio. Los componentes de la capa fina se visualizaron mediante luz UV (254 nm) o por tratamiento de ésta con una disolución de *p*-anisaldehído (2.5%), HOAc (1%) y H₂SO₄ (3.4%) en etanol, seguido de calentamiento.

La caracterización de los clústeres mediante espectroscopía de absorción UV-vis se llevó a cabo en un espectrofotómetro de array de diodos HP 8542A, usando cubetas de cuarzo de 1 cm y 1 mm (HELLMA), dependiendo del volumen de la muestra a medir. Se usó como blanco el disolvente en que se encuentran las muestras, a no ser que se indique lo contrario. Para la asignación de las bandas se llevó a cabo un ajuste lorentziano del espectro con el software ORIGINPRO 8, seguido de la asignación a un clúster determinado mediante una aproximación del modelo del Jellium.^{18, 27, 29}

Las medidas de fluorescencia de las fracciones purificadas por HPLC se llevó a cabo en un fluorímetro VARIAN CARY ECLIPSE, usando cubetas HELLMMA de cuarzo de 1 cm.

Las medidas de TEM se realizaron en un PHILIPS CM-12, usando rejillas de cobre recubiertas con Formvar para las muestras acuosas y carbono vítreo para las muestras en disolventes orgánicos.

El estudio de las propiedades magnéticas de los clústeres se llevó a cabo por EPR de las muestras sólidas, en un BRUKER EMX. Las medidas de susceptibilidad magnética se realizaron en un SQUID (superconducting quantum interference device) de QUANTUM DESIGNS.

La fluorescencia de rayos X se llevó a cabo en un aparato artesanal perteneciente a los servicios generales de la USC.

Los espectros de IR y Raman se obtuvieron por el análisis de los sólidos en pastilla de KBr en un BRUKER IFS-66V y un REMISHAW INVIA REFLEX. Las asignaciones se llevaron a cabo a través de datos tabulados en la bibliografía.¹³³

Los compuestos orgánicos se caracterizaron mediante RMN. Los equipos usados fueron: BRUKER DPX-250. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm respecto a la señal del TMS y las constantes de acoplamiento en Hz. Los espectros se procesaron en el programa MESTRENOVA y se referenciaron usando los valores de los desplazamientos conocidos y tabulados en la bibliografía para el disolvente residual sin deuterar.¹³²

El agua se purificó en un aparato marca MILLIPORE.

Los sólidos obtenidos en las síntesis de clústeres se aislaron por ultracentrifugación en una centrífuga marca SIGMA 2-15.

Los reactivos y disolventes usados fueron obtenidos en general a través de SIGMA-ALDRICH, a excepción de los disolventes de grado HPLC usados para la purificación de clústeres que fueron de la marca PANREAC.

Procedimientos experimentales

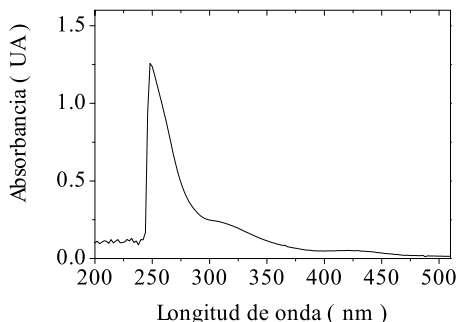
1. Síntesis electroquímica de clústeres de oro

AuCLsE1

En una celda electrolítica se situaron enfrentados un electrodo de trabajo de platino y un contraelectrodo de oro, ambos con una superficie de 2.5 cm², sumergidos en 100 ml de una disolución electrolítica de TBABr 0.1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada por burbujeo de nitrógeno. Todos los potenciales se midieron usando como referencia un electrodo de Ag/AgCl. Con todo el montaje preparado se llevó a cabo una electrolisis galvanostática, aplicando una densidad de corriente de 5 mA/cm² durante 570 s. Durante todo el proceso se mantuvo atmósfera inerte de nitrógeno, fuerte agitación y la temperatura termostatzada a 25±0.1°C.

Una vez terminado el proceso electroquímico la disolución se extrajo de la celda electrolítica y se llevó a cabo la caracterización de los clústeres sintetizados por espectroscopía de absorción UV-vis.

UV (CH₃CN, nm): 249 (Au₂), 260 (Au₂), 299 (Au₃), 425 (Au₁₂).

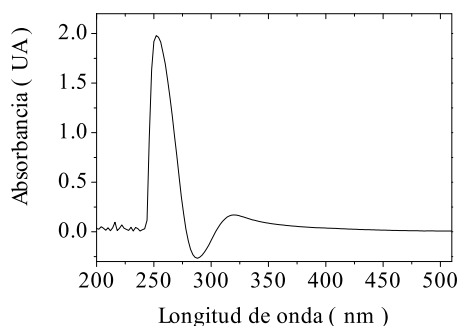


AuCLsE2

En una celda electrolítica se situaron enfrentados un electrodo de trabajo de platino y un contraelectrodo de oro, ambos con una superficie de 2.5 cm^2 , sumergidos en 100 ml de una disolución electrolítica de TBABr 0.1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada por burbujeo de nitrógeno. Todos los potenciales se midieron usando como referencia un electrodo de Ag/AgCl. Con todo el montaje preparado se llevó a cabo una electrolisis galvanostática, aplicando una densidad de corriente de 10 mA/cm^2 durante 628 s. Durante todo el proceso se mantuvo atmósfera inerte de nitrógeno, fuerte agitación y la temperatura termostatzada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Una vez terminado el proceso electroquímico la disolución se extrajo de la celda electrolítica y se llevó a cabo la caracterización de los clústeres sintetizados por espectroscopía de absorción UV-vis. A continuación se separaron tres alícuotas de 20 ml a las que se agregaron aproximadamente el mismo volumen de dodecanotiol en pentano (0.5 M) a distintos tiempos: el mismo día de la reacción, un día después y tras cuatro días de la síntesis; agitando la mezcla con agitación magnética durante 2h aproximadamente,.

UV (CH_3CN , nm): 256 (Au_2), 288 (Au_3), 325 (Au_6).



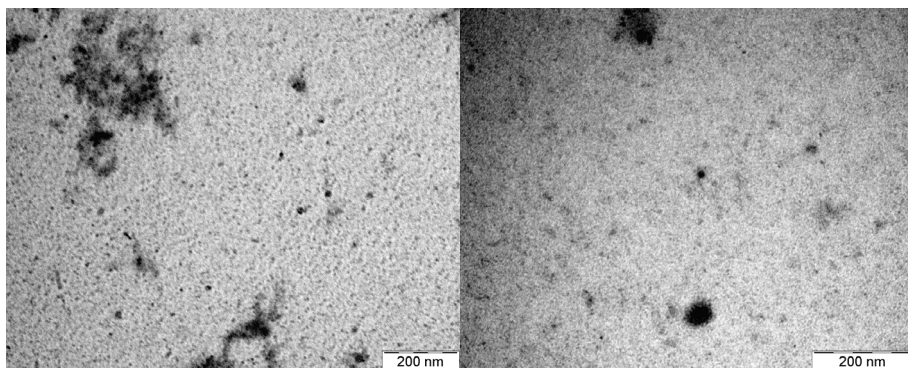
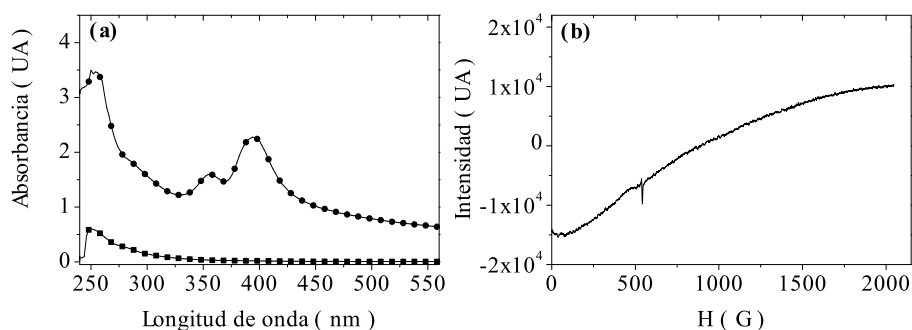
AuCLsE3

En una celda electrolítica se situaron enfrentados un electrodo de trabajo de platino y un contraelectrodo de oro, ambos con una superficie de 2.5 cm^2 , sumergidos en 100 ml de una disolución electrolítica de TOABr 0.1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada por burbujeo de nitrógeno. Todos los

potenciales se midieron usando como referencia un electrodo de Ag/AgCl. Con todo el montaje preparado se llevó a cabo una electrolisis galvanostática, aplicando una densidad de corriente de 10 mA/cm^2 durante 725 s. Durante todo el proceso se mantuvo atmósfera inerte de nitrógeno, fuerte agitación y la temperatura termostatzada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Una vez terminado el proceso electroquímico la disolución se extrajo de la celda y se llevó a cabo la caracterización de los clústeres sintetizados por espectroscopía de absorción UV-vis. A continuación se añadió aproximadamente el mismo volumen de docecanotiol en pentano (0.5 M). Se observó la precipitación de un sólido amarillo que se caracterizó por espectroscopía de absorción UV-vis, TEM y EPR.

UV medio síntesis, figura(a)(■) (CH_3CN , nm): 249 (Au_2), 260 (Au_2), 300 (Au_4). **UV sólido, figura(a)(●) (pentano, nm):** 250 (Au_2), 299 (Au_4), 351 (Au_6), 395 (Au_9). **EPR sólido, figura (b) (9.424 GHz, 120 K).**

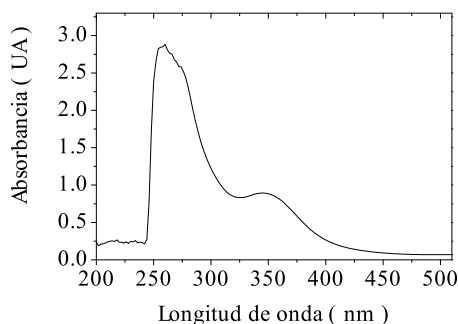


AuCLsE4

En una celda electrolítica se situaron enfrentados un electrodo de trabajo de platino y un contraelectrodo de oro, ambos con una superficie de 2.5 cm^2 , sumergidos en 100 ml de una disolución electrolítica de TBABr 0.1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada por burbujeo de nitrógeno. Todos los potenciales se midieron usando como referencia un electrodo de Ag/AgCl. Con todo el montaje preparado se llevó a cabo una electrolisis galvanostática, aplicando una densidad de corriente de 10 mA/cm^2 durante 945 s. Durante todo el proceso se mantuvo atmósfera inerte de nitrógeno, fuerte agitación y la temperatura termostatzada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Una vez terminado el proceso electroquímico la disolución se extrajo de la celda electrolítica y se llevó a cabo la caracterización de los clústeres sintetizados por espectroscopía de absorción UV-vis. Tras 21 días se añadió aproximadamente el mismo volumen de una disolución de dodecanotiol en pentano (0.5 M).

UV (CH_3CN , nm): 256 (Au_2), 275 (Au_3), 343 (Au_6).



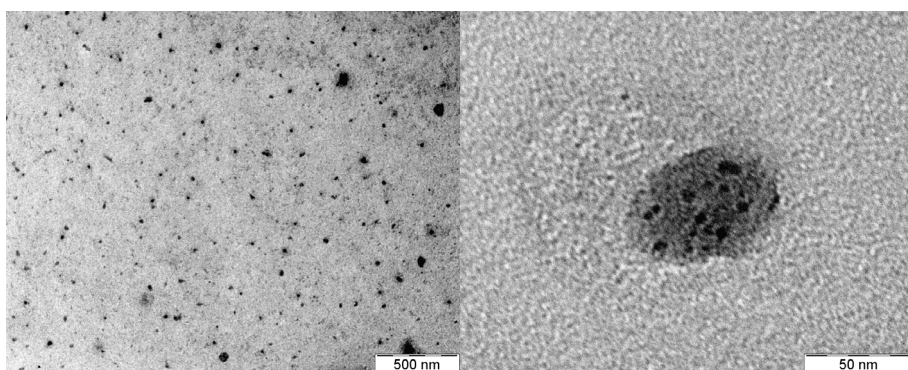
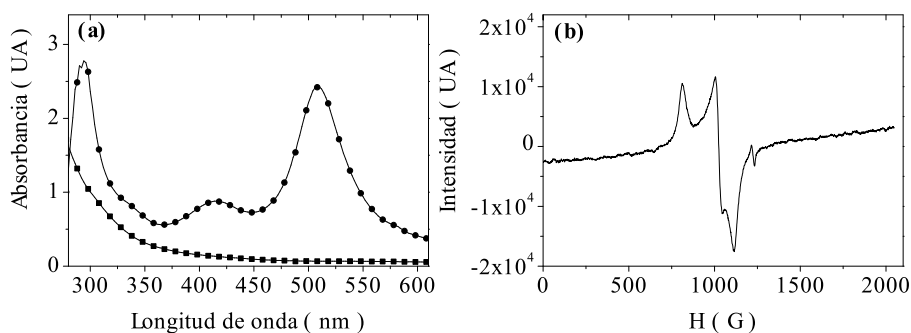
AuCLsE5

En una celda electrolítica se situaron enfrentados un electrodo de trabajo de platino y un contraelectrodo de oro, ambos con una superficie de 2.5 cm^2 , sumergidos en 100 ml de una disolución electrolítica de TBABr 0.1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada por burbujeo de nitrógeno. Todos los potenciales se midieron usando como referencia un electrodo de Ag/AgCl. Con todo el montaje preparado se llevó a cabo una electrolisis galvanostática,

aplicando una densidad de corriente de 10 mA/cm^2 durante 945 s. Durante todo el proceso se mantuvo atmósfera inerte de nitrógeno, fuerte agitación y la temperatura termostatzada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Una vez terminado el proceso electroquímico la disolución se extrajo de la celda electrolítica y se llevó a cabo la caracterización de los clústeres sintetizados por espectroscopía de absorción UV-vis. Tras 10 días se añadió aproximadamente el mismo volumen de una disolución de dodecanotiol en pentano (0.5 M). Se observó la precipitación de un sólido rojo que se caracterizó mediante espectroscopía de absorción UV-vis, TEM y EPR.

UV medio síntesis, figura(a)(■) (CH_3CN , nm): 256 (Au_2), 266 (Au_2), 293 (Au_3). **UV sólido, figura(a)(●) (pentano, nm):** 294 (Au_3), 323 (Au_4), 412 (Au_{10}), 510 (Au_{20}). **EPR sólido, figura (b) (9.424 GHz, 120 K):** 1006 (7.0).

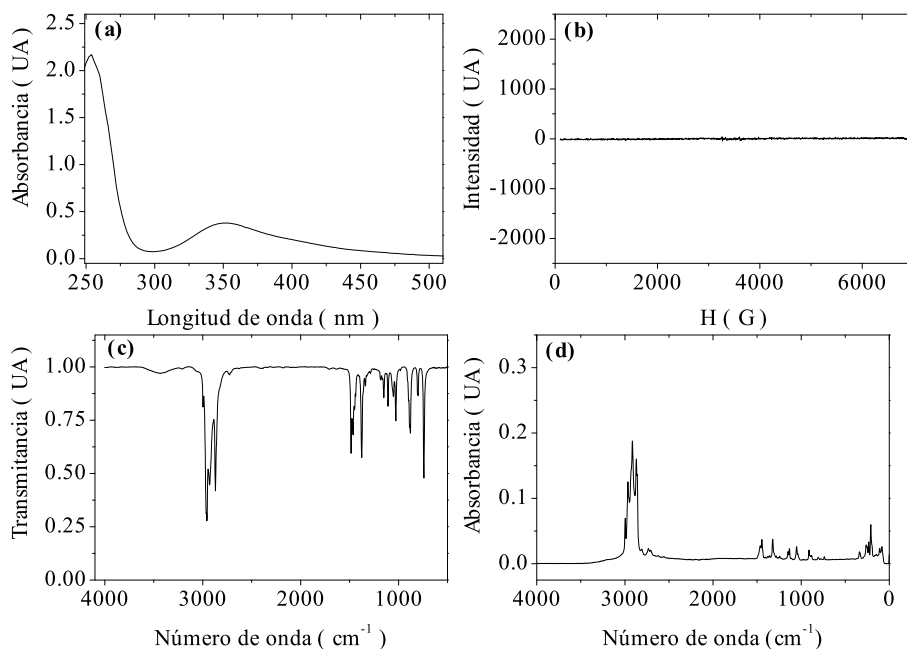


2. Síntesis química de clústeres de oro

AuCLsQ1

En un matraz de fondo redondo de 50 ml se añadieron 31.8 ml de una disolución de TBABr 50 mM en tolueno (1.64 mmol, 2.5 eq) sobre 17.7 ml de una disolución acuosa de HAuCl_4 37 mM (0.65 mmol, 1 eq). Las dos fases se agitaron enérgicamente hasta observar la total extracción del tetracloroaurato de la fase acuosa a la fase orgánica por el intercambio de color de las fases. A continuación se añadieron 0.25 ml de dodecanotiol (1.06 mmol, 1.6 eq), dejando la reacción agitando durante aproximadamente 48 h, tras lo que se observó la precipitación de un sólido rojo en la interfase. La evolución de la síntesis se siguió mediante espectroscopía de absorción UV-vis. Una vez completada la reacción se separaron las fases por decantación. El sólido rojo se aisló por ultracentrifugación y se caracterizó por espectroscopía de absorción UV-vis, IR y Raman, análisis elemental, fluorescencia de RX y EPR.

UV figura (a) (CHCl_3 , nm): 255 (Au_2), 351 (Au_6), 400 (Au_{10}). **Raman figura (d) (cm^{-1}):** 149, 209, 232. **AE:** calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{N}]$: C (16), H (36), N (1); encontrado: C (17), H (37), N (1). **Fluo RX:** Au (1), Br (2)



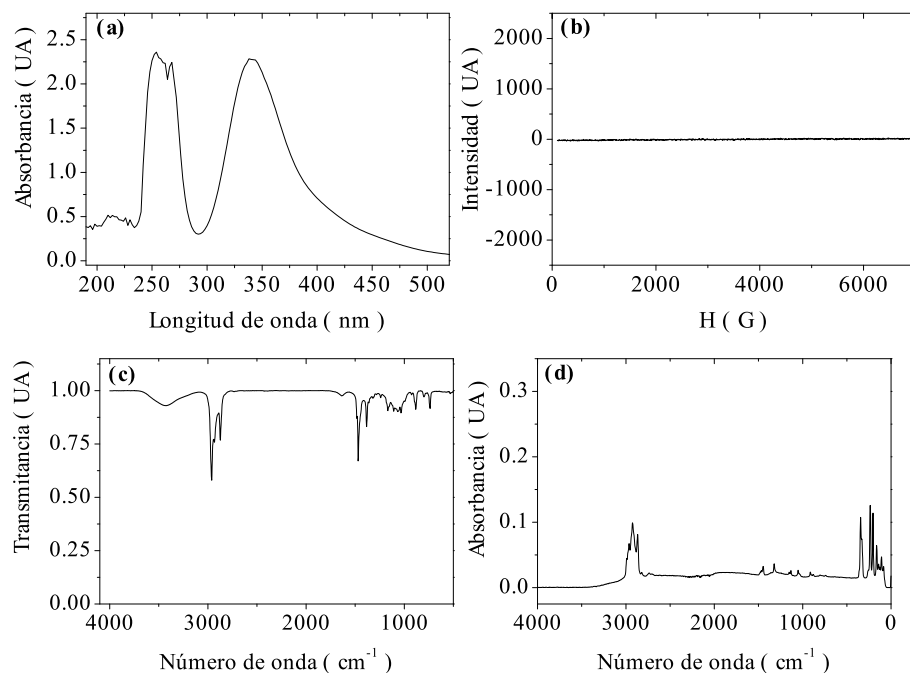
AuCl₂Q2

En un vial de 25 ml se añadieron 7.2 ml de una disolución de TBABr 53 mM en tolueno (0.38 mmol, 2.5 eq) sobre 4 ml de una disolución acuosa de HAuCl₄ 37 mM (0.15 mmol, 1 eq). Las dos fases se agitaron enérgicamente hasta observar la total extracción del tetracloroaurato de la fase acuosa a la fase orgánica por el intercambio de color de las fases. A continuación se añadieron 16.2 mg de D-glucosa (0.10 mmol, 0.7 eq), dejando la reacción agitando durante aproximadamente 8 días, tras lo que se observó la precipitación de un sólido naranja en la interfase. La evolución de la síntesis se siguió mediante espectroscopía de absorción UV-vis. Una vez completada la reacción se separaron las fases por decantación. El sólido se aisló por ultracentrifugación y se caracterizó por espectroscopía de absorción UV-vis, IR y Raman, análisis elemental, fluorescencia de RX y EPR.

UV figura (a) (CHCl₃, nm): 253 (Au₂), 268 (Au₂), 322 (Au₄), 399 (Au₁₀).

Raman figura (d) (cm⁻¹): 107, 126, 140, 163, 203, 234, 344. **AE:** calculado para [C₁₆H₃₆N]: C (16), H (36), N (1); encontrado: C (18), H (42), N (1).

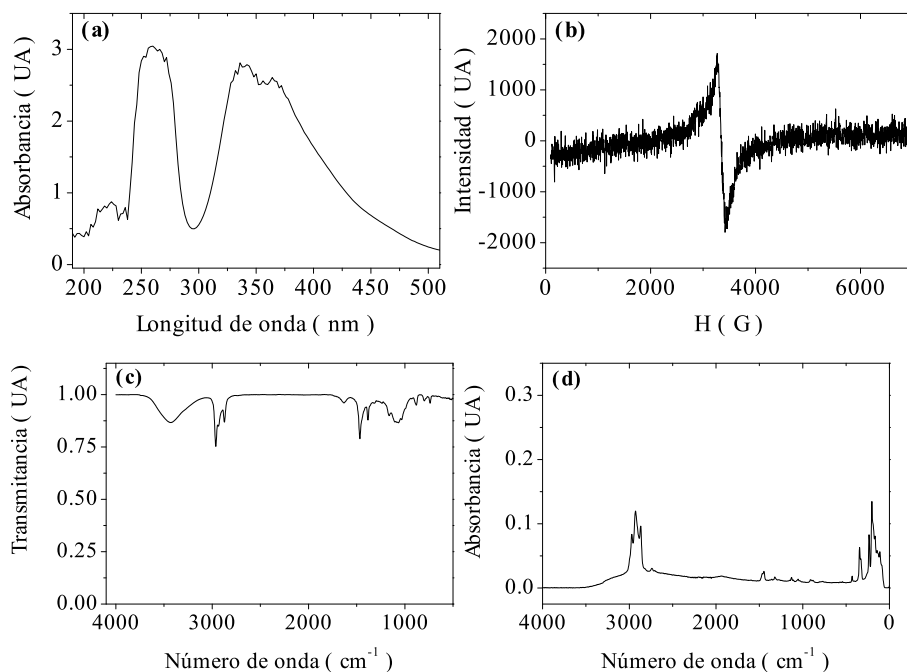
Fluo RX: Au (1), Br (2).



AuCl₃Q3

En un vial de 25 ml se añadieron 9.3 ml de una disolución de TBABr 50 mM en tolueno (0.47 mmol, 2.5 eq) sobre 5.2 ml de una disolución acuosa de HAuCl₄ 37 mM (0.19 mmol, 1 eq). Las dos fases se agitaron enérgicamente hasta observar la total extracción del tetracloroaurato de la fase acuosa a la fase orgánica por el intercambio de color de las fases. A continuación se añadieron 17.3 mg de hipofosfito sódico (0.16 mmol, 0.85 eq), dejando la reacción agitando durante aproximadamente 24 h, tras lo que se observó la precipitación de un sólido rojo en la interfase. La evolución de la síntesis se siguió mediante espectroscopía de absorción UV-vis. Una vez completada la reacción se separaron las fases por decantación. El sólido se aisló por ultracentrifugación y se caracterizó por espectroscopía de absorción UV-vis, IR y Raman, análisis elemental, fluorescencia de RX y EPR.

UV figura (a) (CHCl₃, nm): 260 (Au₂), 335 (Au₅), 366 (Au₇), 407 (Au₁₀).
Raman figura (d) (cm⁻¹): 110, 127, 142, 166, 186, 202, 235, 330, 345, 429. **Fluo RX:** Au (1), Br (3). **EPR figura (b) (9.424 GHz, 300K):** 3300 (2.01).



AuCl₄Q4

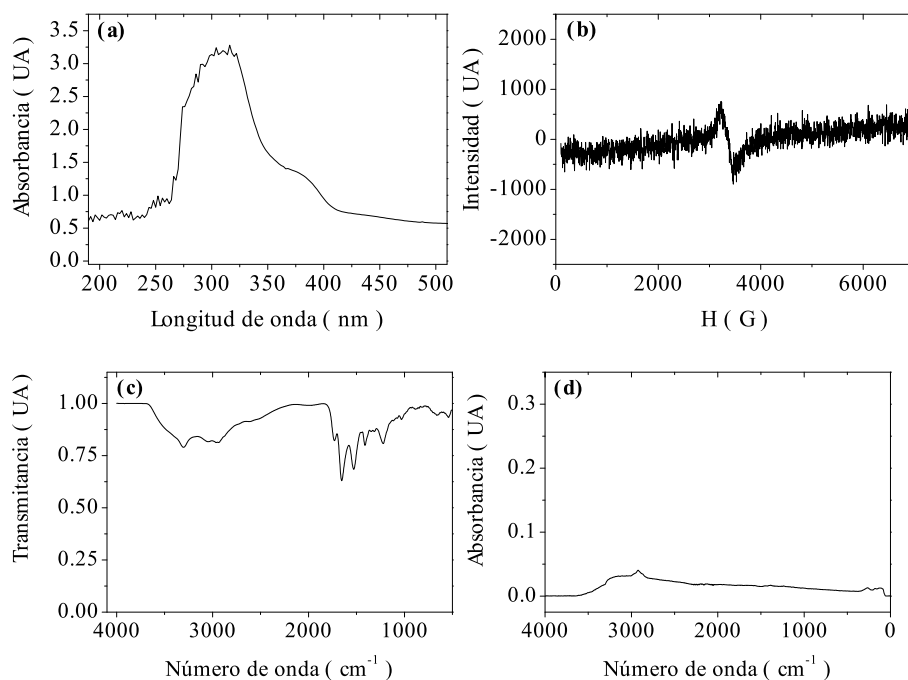
En un vial de 25 ml se añadieron 6.2 ml de una disolución de TBABr 50 mM en tolueno (0.30 mmol, 2.5 eq) sobre 4.3 ml de una disolución acuosa de H₂AuCl₄ 37 mM (0.12 mmol, 1 eq). Las dos fases se agitaron enérgicamente hasta observar la total extracción del tetracloroaurato de la fase acuosa a la fase orgánica por el intercambio de color de las fases. A continuación se añadieron 20 µl de oleilamina (0.04 mmol, 0.33 eq). Tras 48 h de agitación se observó la formación de una emulsión entre las dos fases que impidió el seguimiento de la reacción.

AuCl₅Q5

En un vial de 25 ml se añadieron 6 ml de una disolución de TBAAc 50 mM en tolueno (0.30 mmol, 2.1 eq) sobre 4 ml de una disolución acuosa de HAuCl₄ 35 mM (0.14 mmol, 1 eq). Las dos fases se agitaron enérgicamente hasta observar la total extracción del tetracloroaurato de la fase acuosa a la fase orgánica por el intercambio de color de las fases. A continuación se añadieron 61.3 mg de glutation (0.20 mmol, 1.4 eq), dejando la reacción agitando durante aproximadamente 12 días, tras lo que se observó la precipitación de un sólido violeta en la interfase. La evolución de la síntesis se siguió mediante espectroscopía de absorción UV-vis.

Una vez completada la reacción se separaron las fases por decantación. El sólido se aisló por ultracentrifugación y se caracterizó por espectroscopía de absorción UV-vis, IR y Raman, análisis elemental, fluorescencia de RX y EPR.

UV figura (a) (CHCl₃, nm): 286 (Au₃), 311 (Au₄), 379 (Au₈). **EPR figura (b) (9.424 GHz, 300K):** 3300 (2.01).

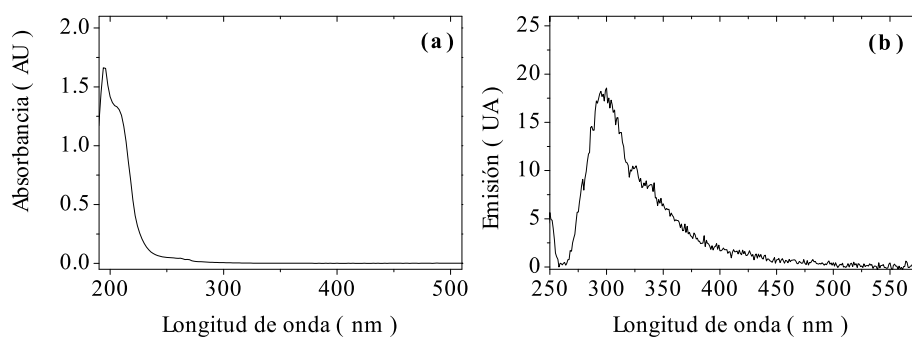


3. Purificación de clústeres por HPLC

AuCLsH1

Muestra proporcionada por Nanogap sintetizada mediante un proceso electroquímico con NaCl como electrolito soporte.

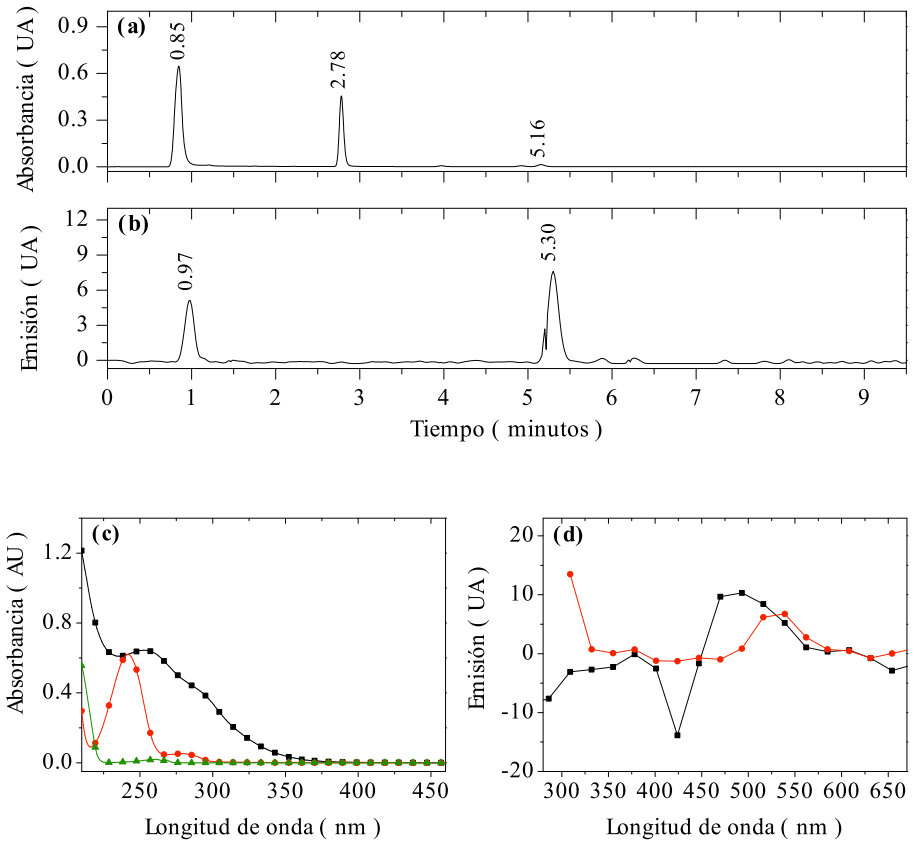
Muestra inicial: (a) espectro absorción, (b) espectro de emisión excitando a 230 nm.



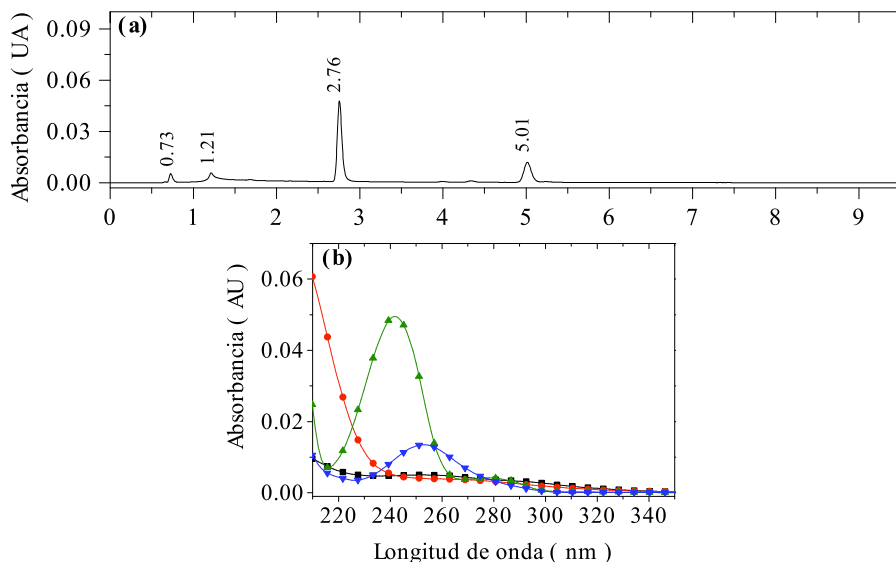
Inyecciones: resumen de las inyecciones y condiciones de elución de la muestra AuCLsH1, fase reversa, columna C18 acoplada a una precolumna del mismo relleno, detector absorbancia y fluorescencia.

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
1	2	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	230	barrido 240-600
2	6	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	—	—
3	3	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	—	—

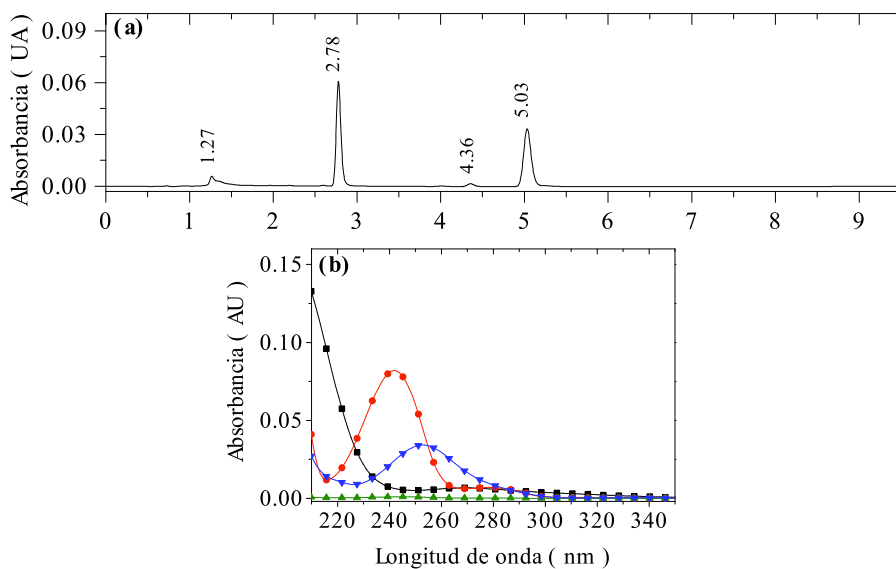
Inyección 1: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 250 nm y **(b)** emisión a 539 nm; espectros de **(c)** absorción a 0.85 (■), 2.78 (●), 5.16 (▲), **(d)** emisión a 0.97 (■) y 5.30 min (●).



Inyección 2: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 250 nm; **(b)** espectros de absorción a 0.73 (■), 1.21 (●), 2.76 (▲) y 5.01 min (▼).



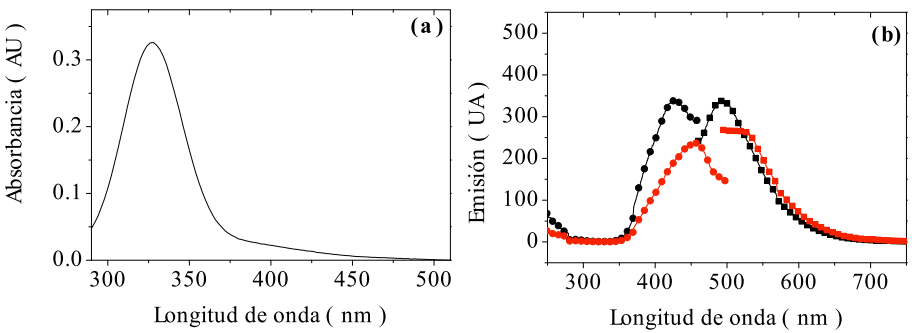
Inyección 3: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 250 nm; **(b)** espectros de absorción a 1.27 (■), 2.78 (●), 4.36 (▲) y 5.03 min (▼).



AuCLsH2

Muestra sintetizada por Maria Rodríguez mediante un método químico en dos fases, usando como agente de transferencia de fase THANO₃.

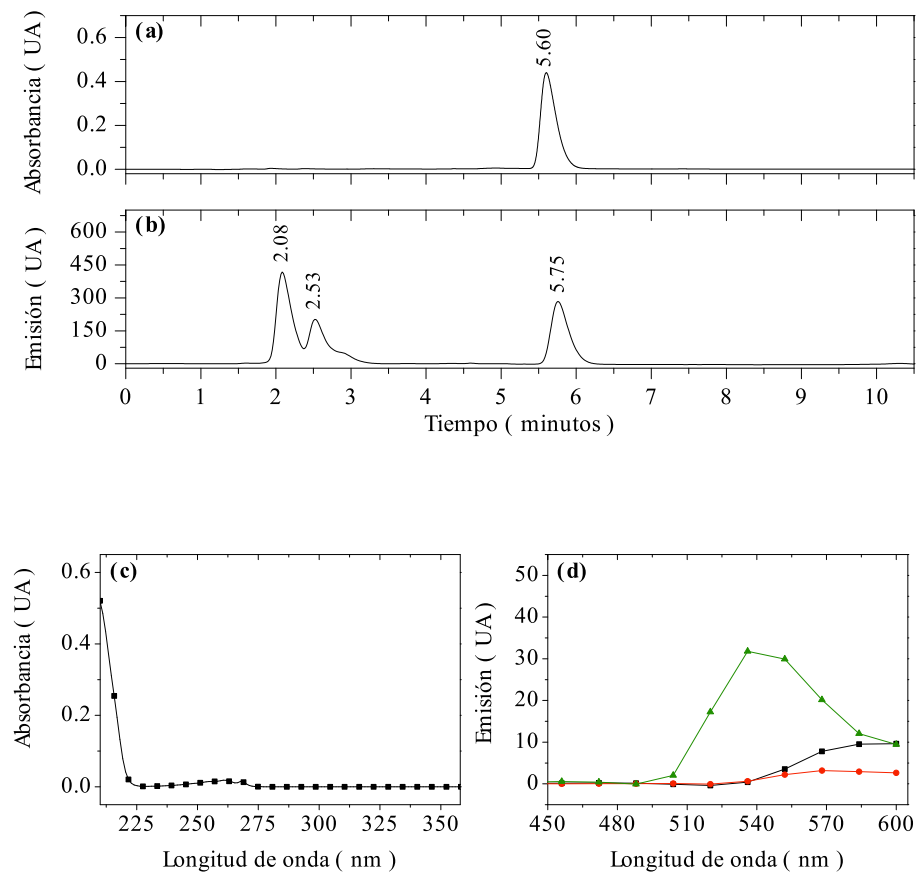
Muestra inicial: (a) Espectro de absorción; (b) espectros de emisión a 430 nm (■) y 460 nm (■) de excitación y espectros de excitación a 490 nm (●) y 540 nm (●) de emisión.



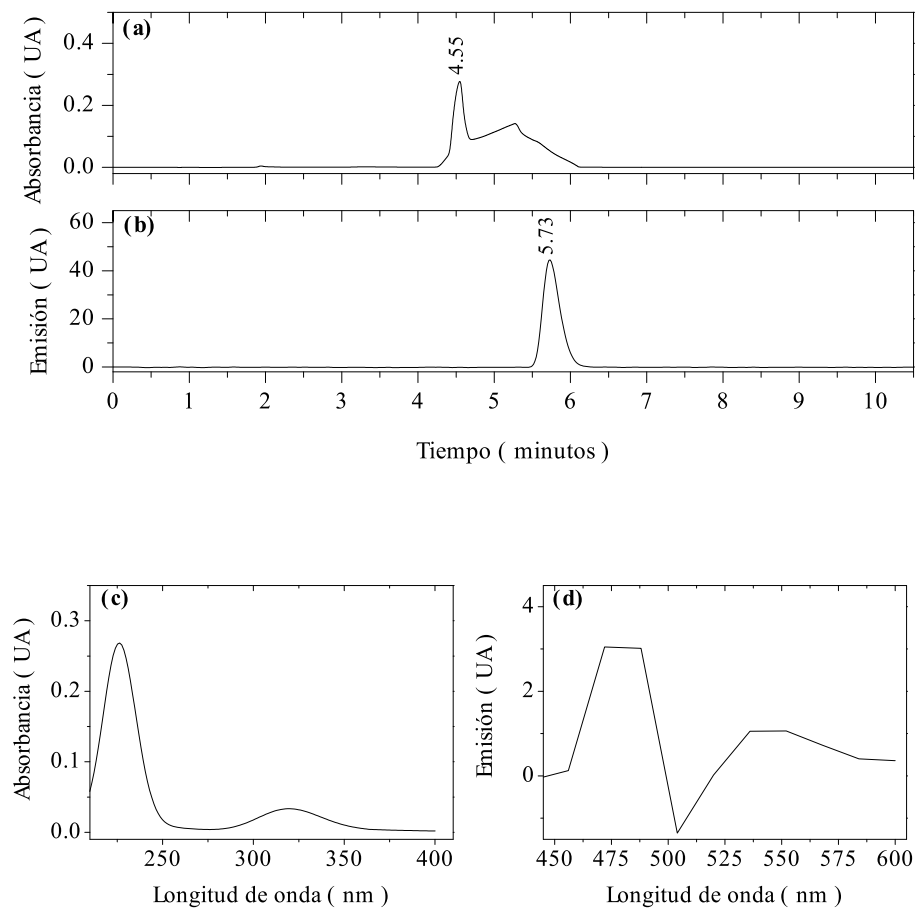
Inyecciones: Resumen de las inyecciones y condiciones de elución de la muestra AuCLsH2, fase reversa, columna C18 acoplada a una precolumna del mismo relleno, detector absorbancia y fluorecencia.

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
1	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
2	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
3	200	20	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600

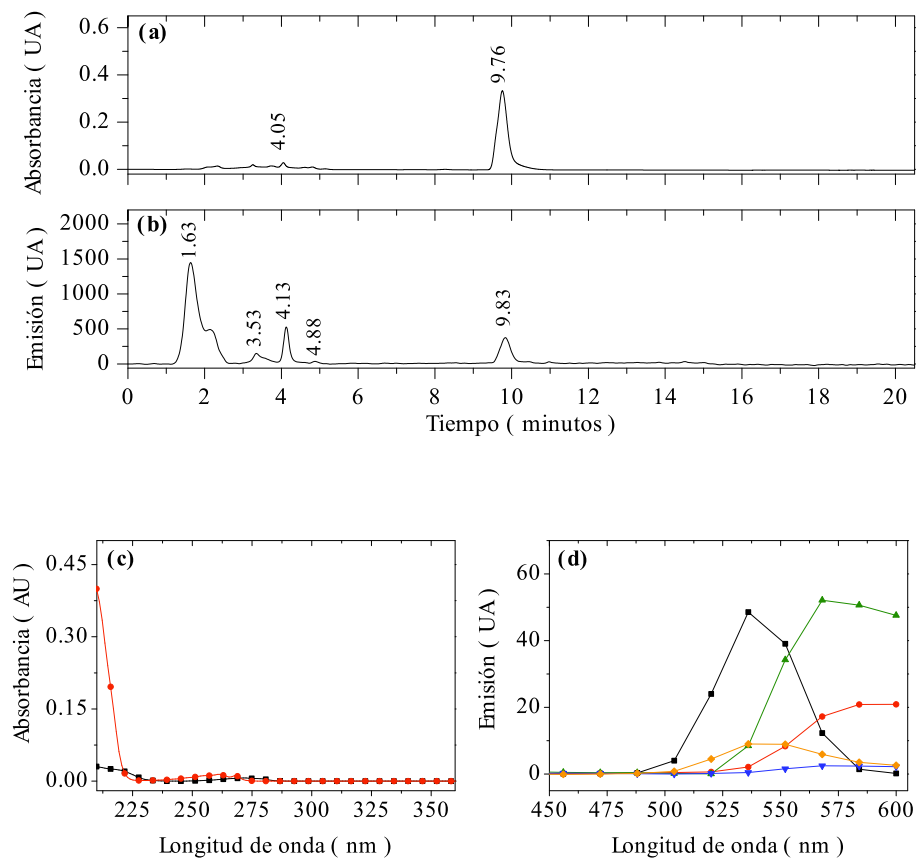
Inyección 1: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 212 nm y **(b)** emisión a 296 nm; espectros de **(c)** absorción a 5.60 min (■), **(d)** emisión a 2.08 (■), 2.53 (●) y 5.75 min (▲).



Inyección 2: THAClO_4 en tolueno, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 222 nm y **(b)** emisión a 280 nm; espectros de **(c)** absorción a 4.55 min, **(d)** emisión a 5.73 min.



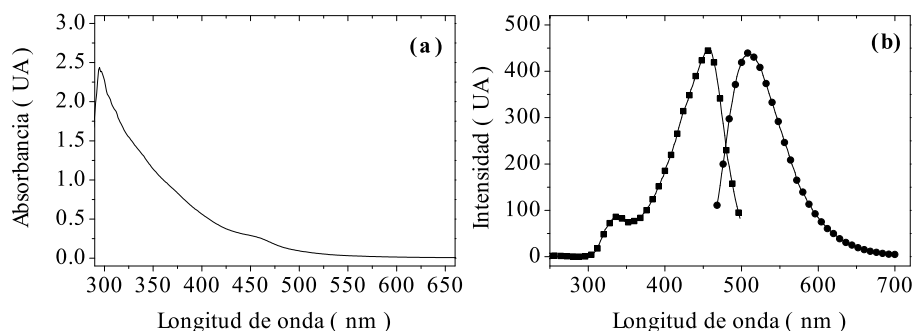
Inyección 3: Muestra, columna preparativa. Cromatogramas de **(a)** absorción a 212 nm y **(b)** emisión a 280 nm; espectros de **(c)** absorción a 4.05 (■) y 9.76 min (●), **(d)** emisión a 1.63 (■), 3.35 (●), 4.13 (▲), 4.87 (▼) y 9.83 min (◆).



AgCLsH1

Muestra de clústeres de plata sintetizados por Maria Rodríguez mediante un proceso de irradiación UV y transferidos a medio acuoso con glutatión.

Muestra inicial: (a) Espectro de absorción, (b) espectros de excitación a 508 nm de emisión y (■) espectro de emisión a 458 nm de excitación (●).

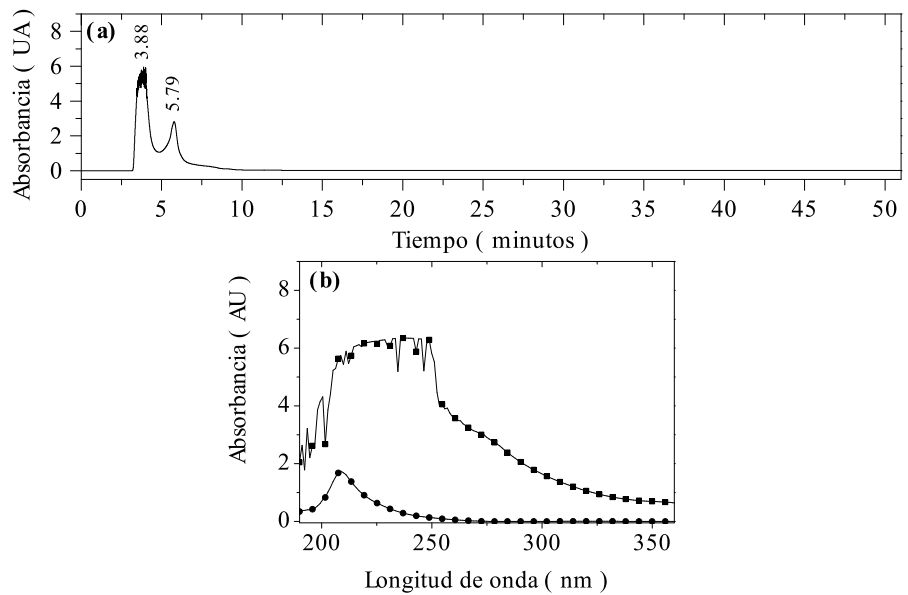


Inyecciones: Resumen de las inyecciones y condiciones de elución de la muestra AgCLsH1, fase reversa, columna C18 acoplada a una precolumna del mismo relleno, detector absorbancia y fluorescencia.

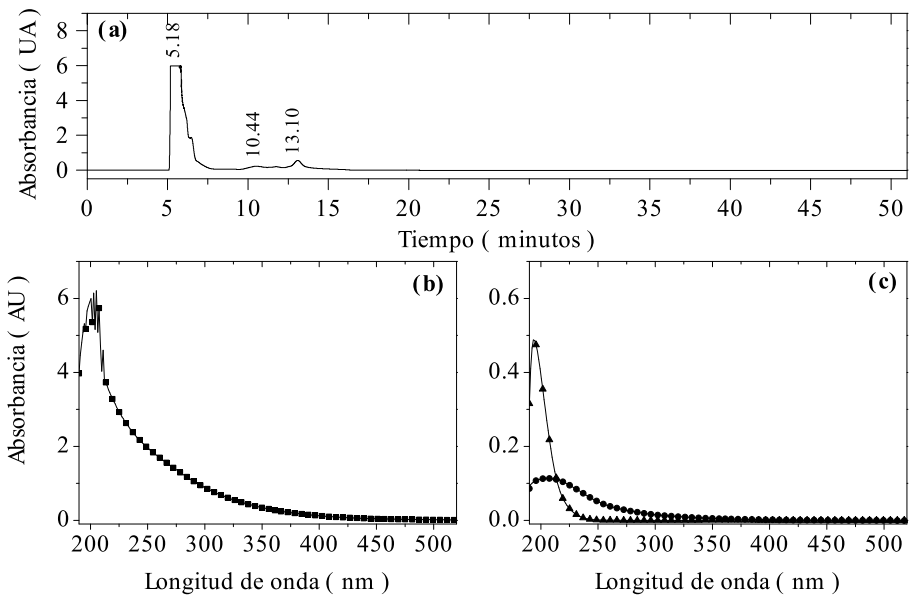
	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
1	20	0.25	90:10 MeOH:H ₂ O	—	—
2	20	0.25	10:90 MeOH:H ₂ O	—	—
3	20	0.25	10:90 CH ₃ CN:H ₂ O	—	—
4	20	0.25	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	—	—
5	20	0.25	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O (0.1 M ác.fórmico)	—	—

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
6	20	0.25	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	—	—
7	20	0.8	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	340	barrido 350-600
8	20	0.8	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600
9	20	0.8	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	390	barrido 400-600
10	20	0.8	5' 50:50 30' 50:50 a 99:1 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600
11	20	0.8	30' 70:30 a 99:1 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600
12	20	0.8	30' 100:0 a 50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600
13	20	0.8	60' 100:0 a 50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600
14	20	0.8	30' 100:0 a 50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	340	barrido 350-600
15	20	0.8	30' 100:0 a 50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	390	barrido 400-600
16	20	0.8	30' 100:0 a 50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600

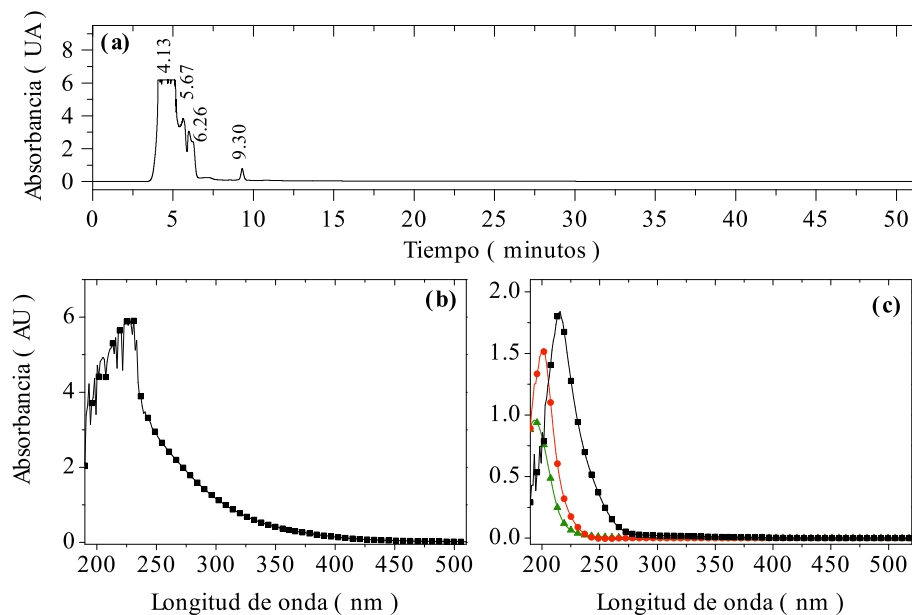
Inyección 1: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 210 nm; **(b)** espectros de absorción a 3.88 (■) y 5.79 min (●).



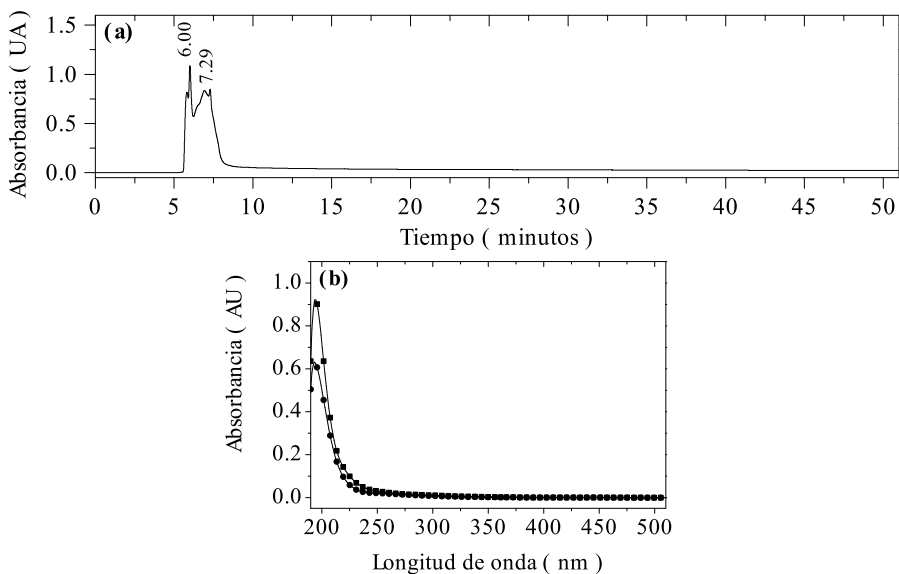
Inyección 2: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 200 nm; **(b)** espectros de absorción a 5.18 (■), **(c)** 10.14 (●) y 13.10 min (▲).



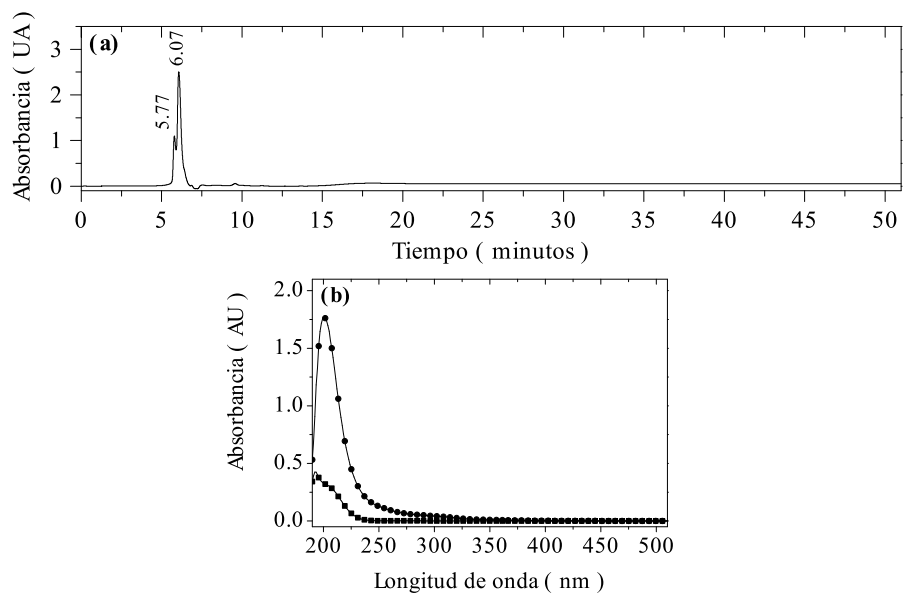
Inyección 3: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 202 nm; **(b)** espectros de absorción a 4.13 (■), **(c)** 5.67 (■), 6.26 (●) y 9.30 min (▲).



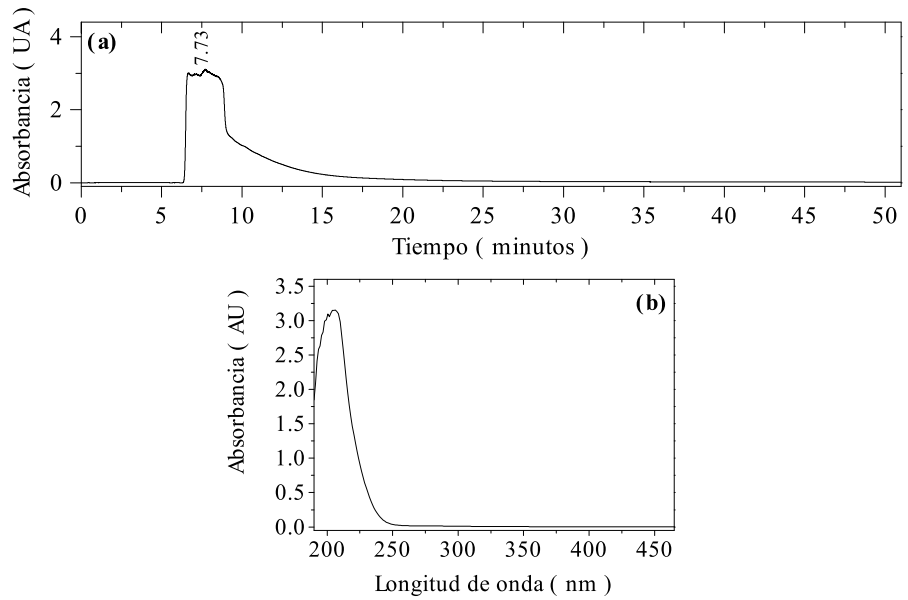
Inyección 4: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 200 nm; **(b)** espectros de absorción a 6.00 (■) y 7.29 min (●).



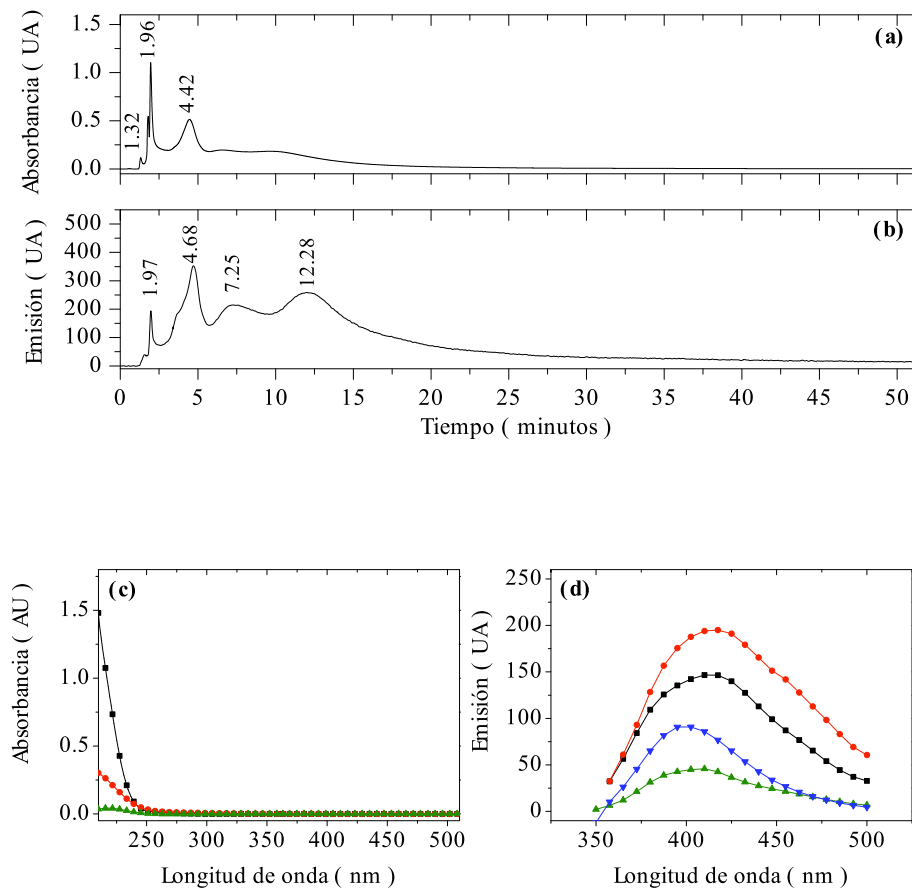
Inyección 5: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 200 nm; **(b)** espectros de absorción a 5.77 (■) y 6.07 min (●).



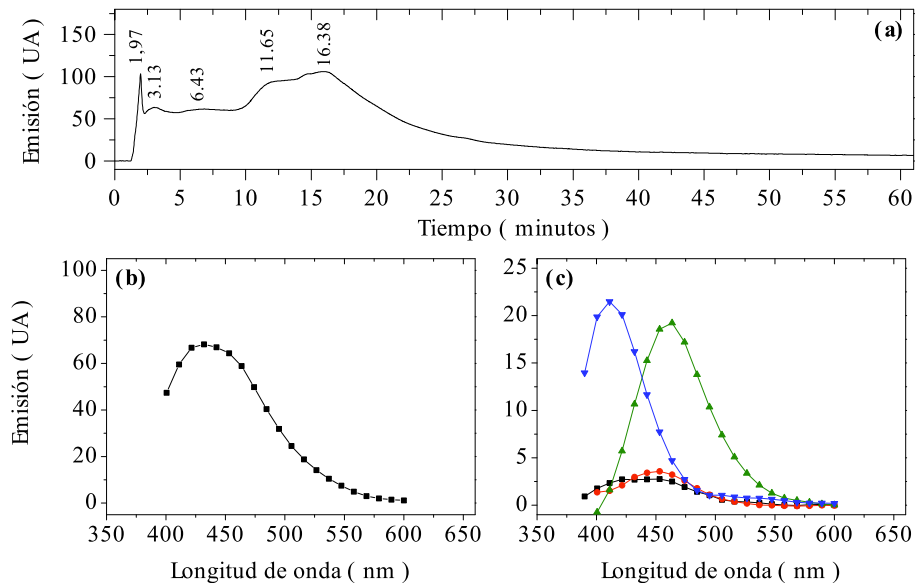
Inyección 6: Glutación en agua, columna analítica. **(a)** Cromatograma de absorción a 200 nm; **(b)** espectro de absorción a 7.73 min.



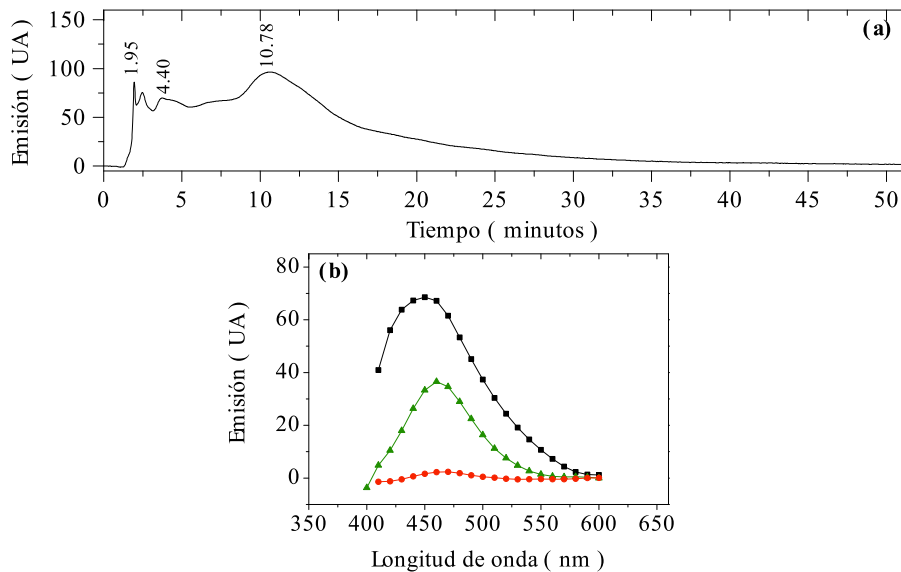
Inyección 7: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 410 nm, espectros de **(c)** absorción a 1.32 (■), 1.96 (●) y 4.42 min (▲); **(d)** emisión a 1.97 (■), 4.68 (●), 7.25 (▲) y 12.28 min (▼).



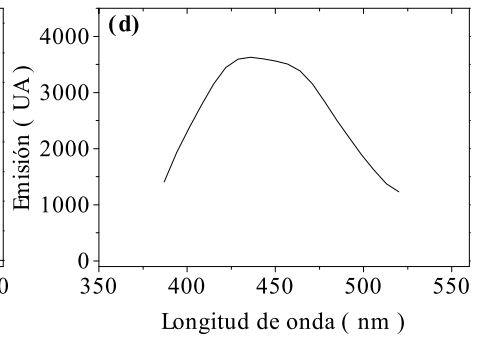
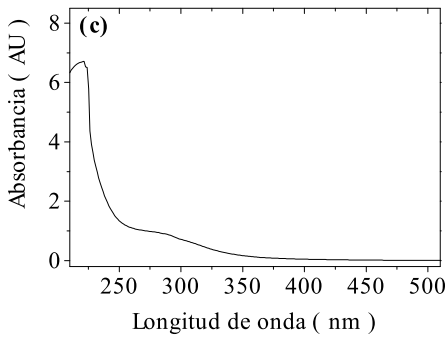
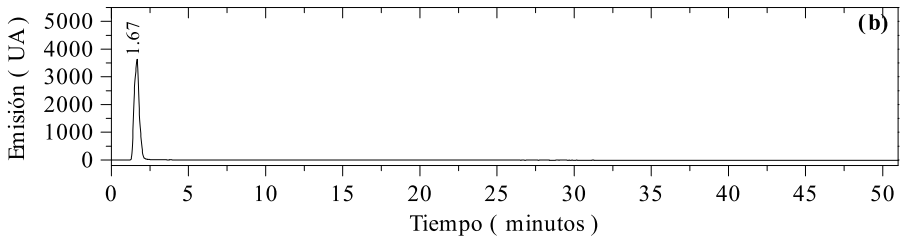
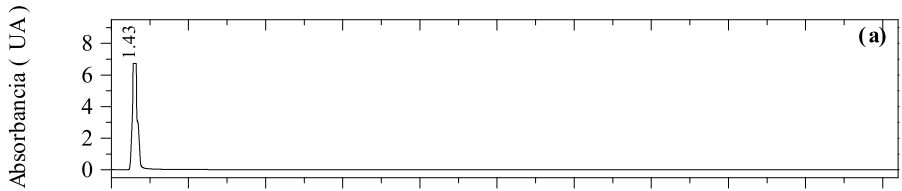
Inyección 8: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 432 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.97 (■), **(c)** 3.13 (■), 6.43 (●), 11.65 (▲) y 16.38 min (▼).



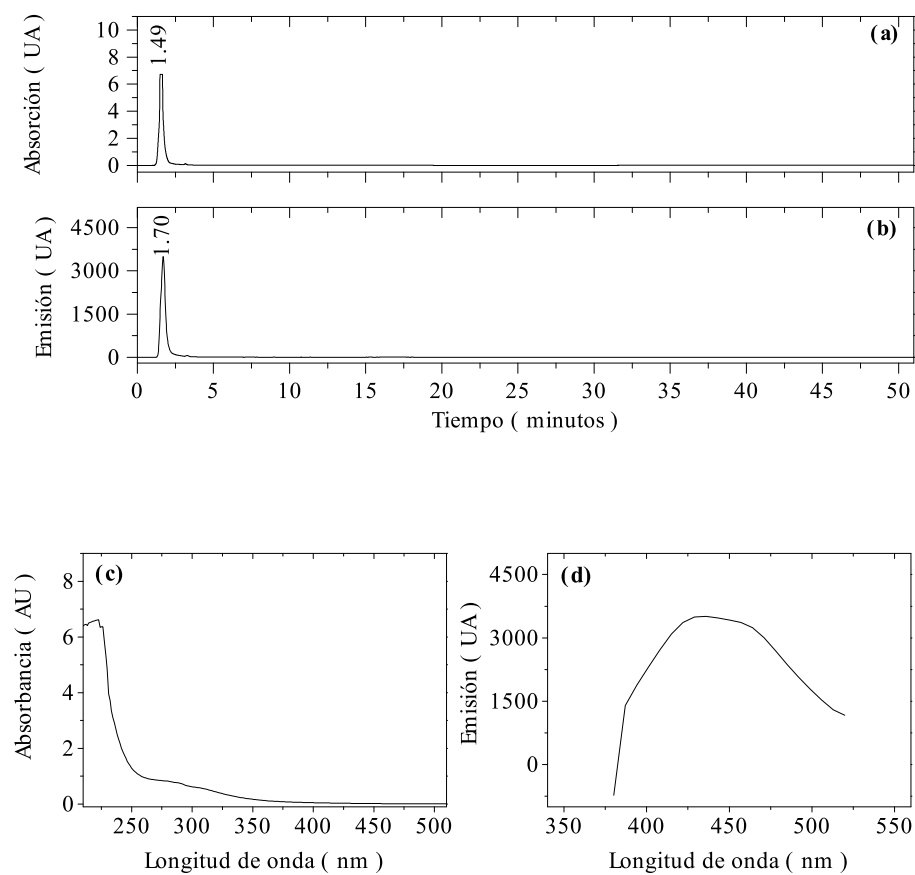
Inyección 9: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 460 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.95 (■), 4.40 (●) y 10.78 min (▲).



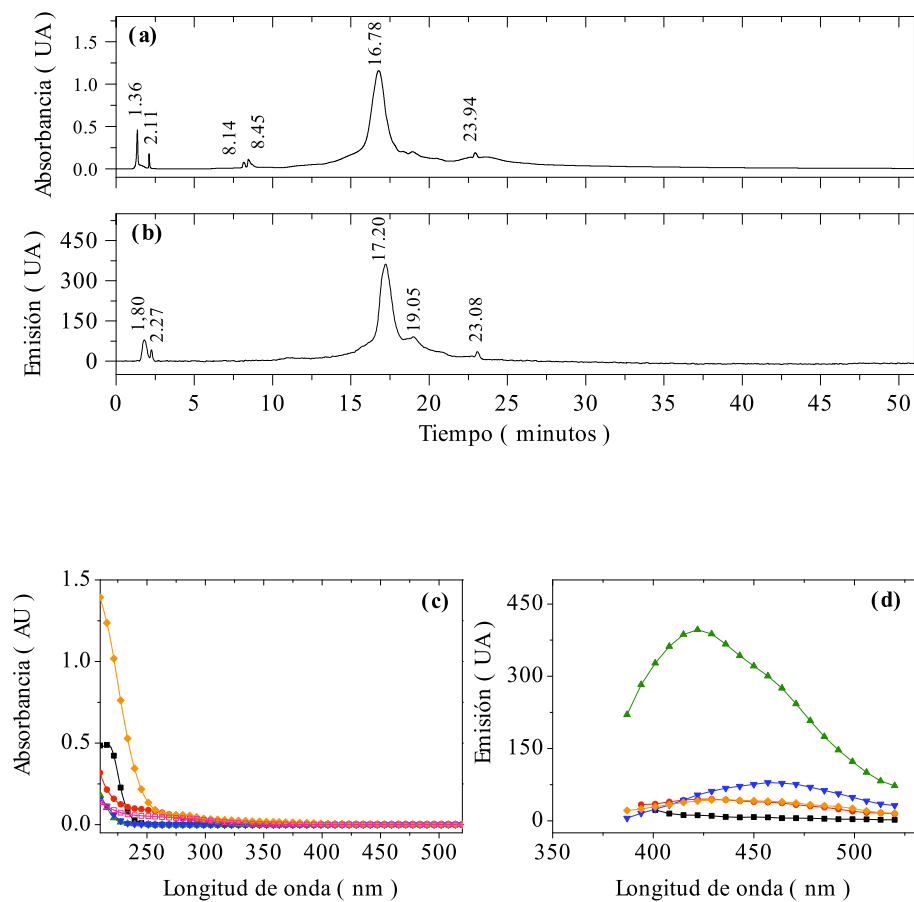
Inyección 10: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 429 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.43 min y **(d)** emisión a 1.67 min.



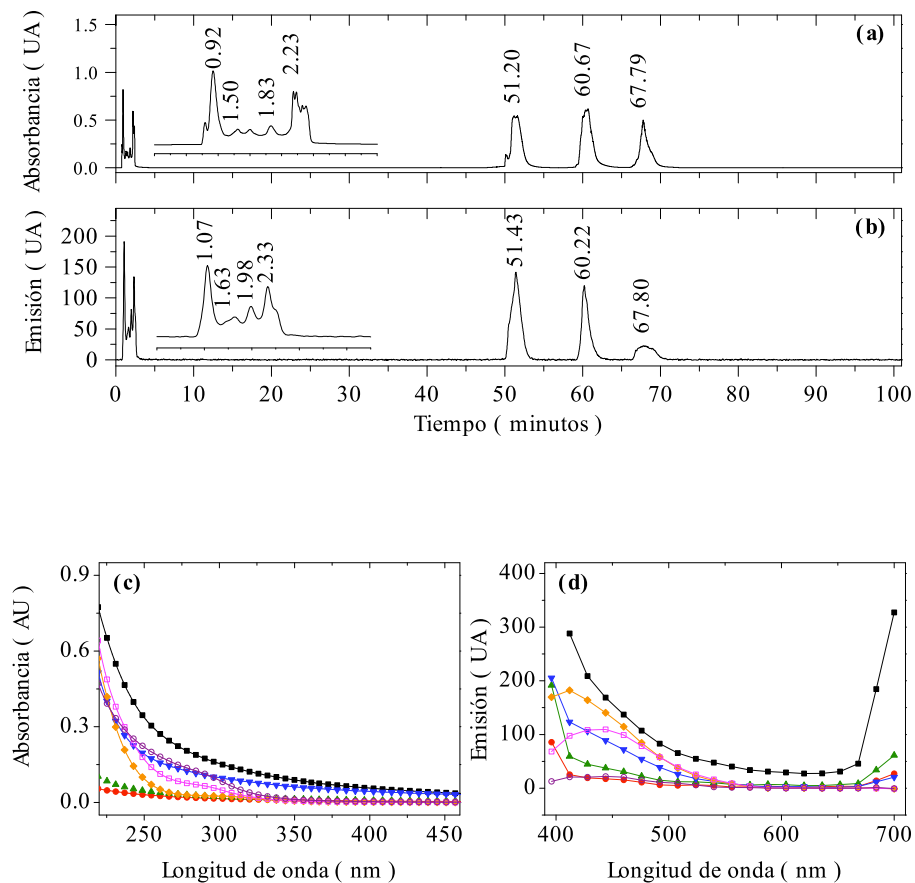
Inyección 11: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 443 nm, seguidos de los correspondientes espectros de **(c)** absorción a 1.49 min y **(d)** emisión a 1.70 min.



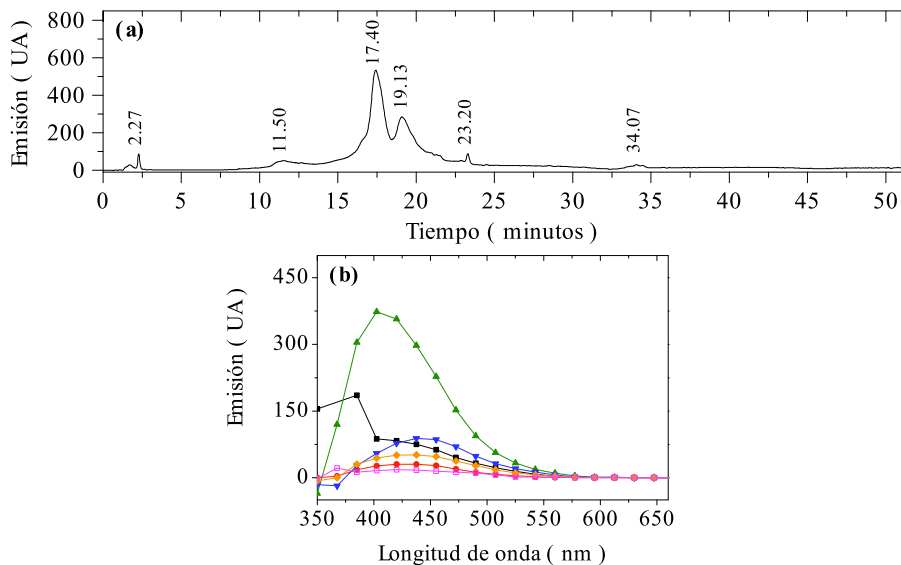
Inyección 12: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 443 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.36 (■), 2.11 (●), 8.14 (▲), 8.45 (▼), 16.78 (◆) y 23.94 min (□), **(d)** emisión a 1.80 (■), 2.27 (●), 17.20 (▲), 19.05 (▼) y 23.08 min (◆).



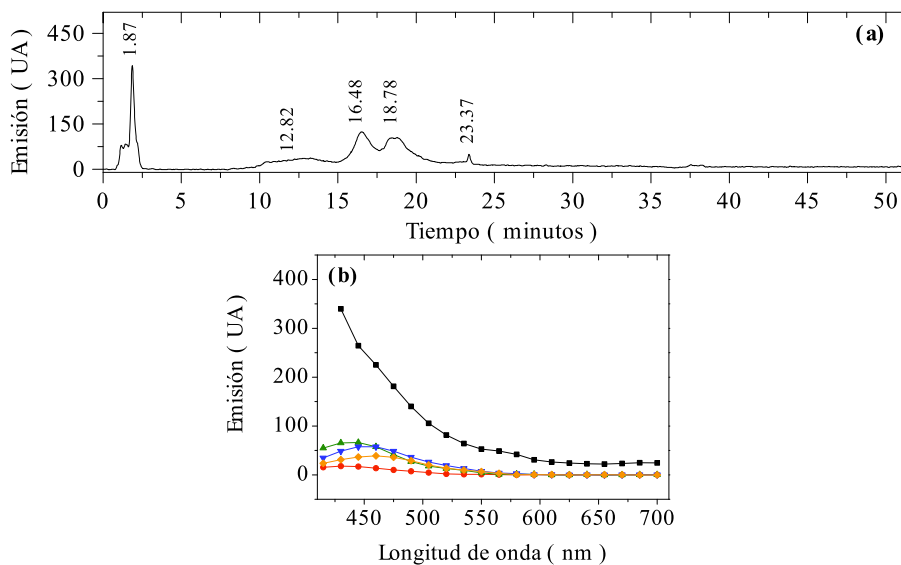
Inyección 13: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 444 nm; espectros de **(c)** absorción a 0.92 (■), 1.50 (●), 1.83 (▲), 2.23 (▼), 51.20 (◆), 60.67 (◻) y 67.79 min (○), **(d)** emisión a 1.07 (■), 1.63 (●), 1.98 (▲), 2.33 (▼), 51.43 (◆), 60.22 (◻) y 67.80 min (○).



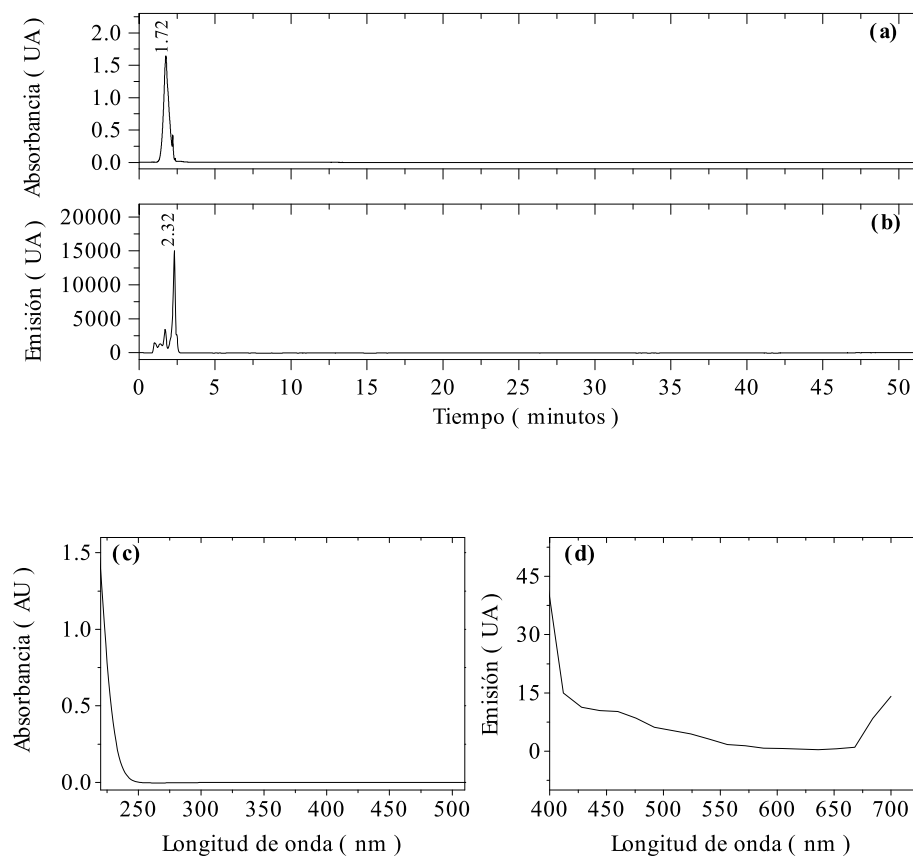
Inyección 14: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 420 nm; **(b)** espectros de emisión a 2.27 (■), 11.50 (●), 17.40 (▲), 19.13 (▼), 23.20 (◆) y 34.37 min (□).



Inyección 15: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 420 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.87 (■), 12.82 (●), 16.48 (▲), 18.78 (▼) y 23.27 min (◆).



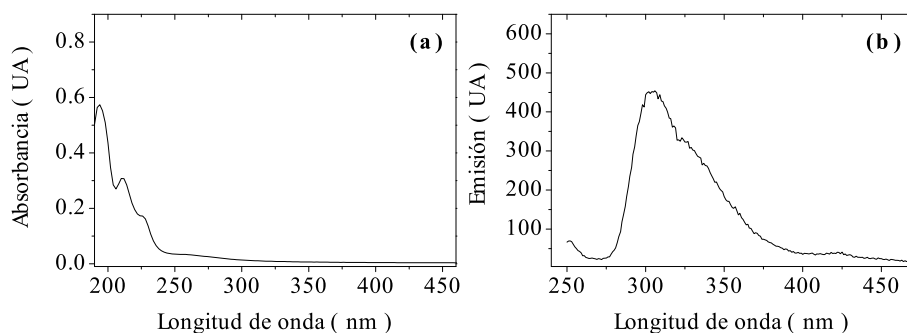
Inyección 16: AgNO_3 en agua, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 380 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.72 min y **(d)** emisión a 2.32 min.



AgCLsH2

Muestra de clústeres de plata proporcionada por la empresa Nanogap, sintetizados mediante un método electroquímico con NaCl como electrolito soporte.

Muestra inicial: (a) Espectro de absorción y (b) espectro de emisión excitando a 230 nm.



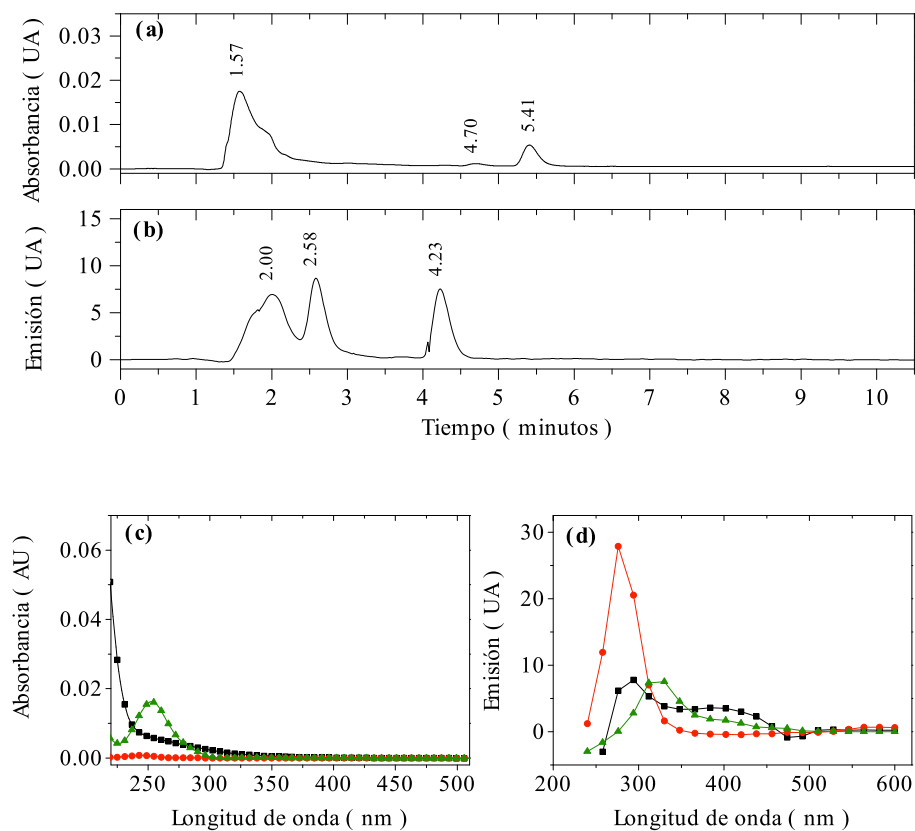
Inyecciones: resumen de las inyecciones y condiciones de elución de la muestra AgCLsH2, fase reversa, columnas C18 (1-19, 28) y NH2 (20-27) acopladas a una precolumna del mismo relleno, detector absorbancia y fluorescencia.

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
1	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	230	barrido 240-600
2	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
3	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
4	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	300	barrido 310-600
5	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	310	barrido 320-600

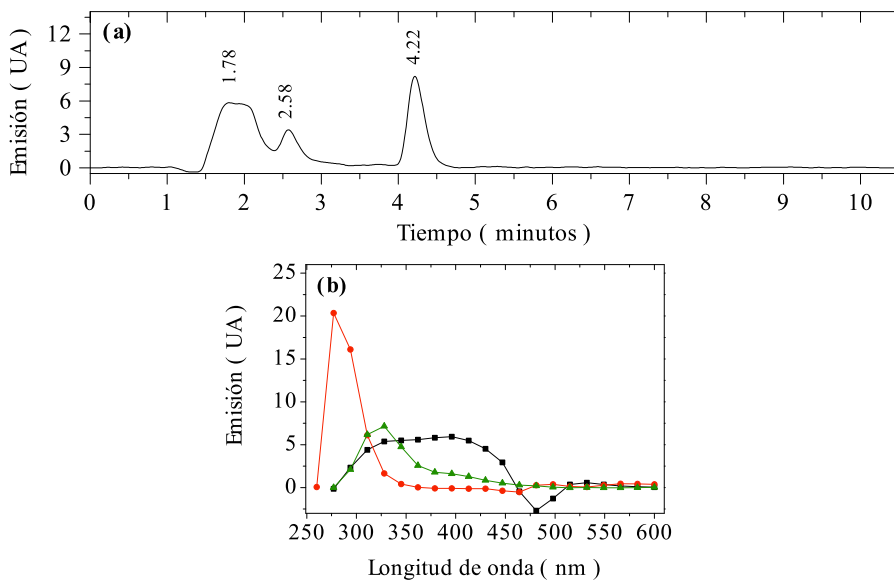
	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
6	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	330	barrido 340-600
7	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	350	barrido 360-600
8	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 380-600
9	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	390	barrido 400-600
10	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	410	barrido 420-600
11	10	1	50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
12	10	1	40:60 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
13	10	1	70:30 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
14	10	1	70:30 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
15	10	1	60:40 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
16	10	1	50:50 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
17	10	1	40:60 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
18	10	1	45:55 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
19	10	1	65:35 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
20	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
21	10	1	50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
22	10	1	40:60 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
23	10	1	70:30 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
24	10	1	80:20 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
25	10	1	90:10 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
26	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
27	10	1	70:30 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
28	200	20	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600

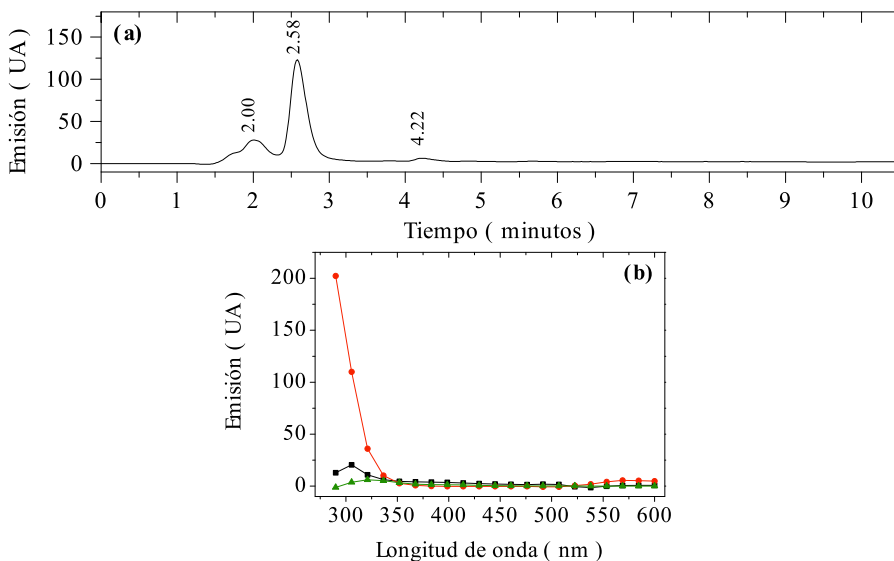
Inyección 1: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 230 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.57 (■), 4.70 (●) y 5.41 min (▲), **(d)** emisión a 2.00 (■), 2.58 (●) y 4.23 min (▲).



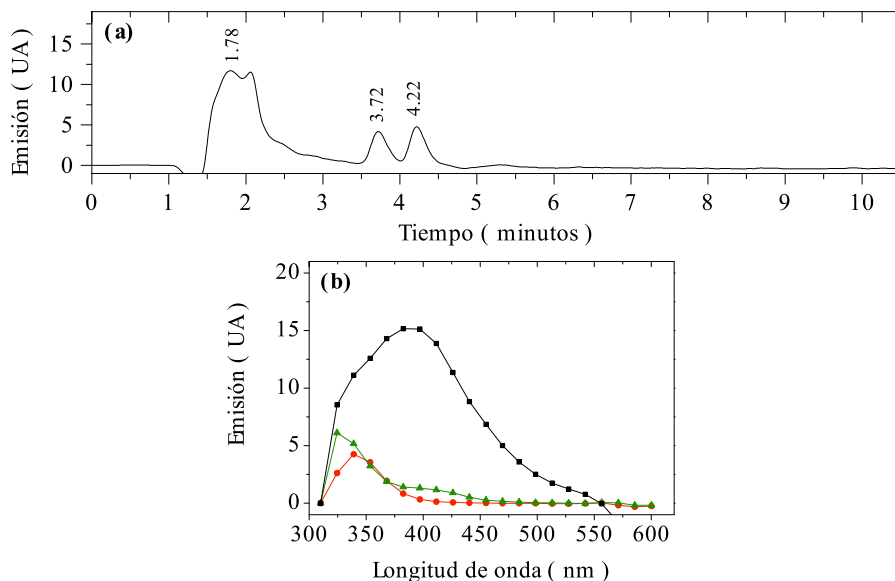
Inyección 2: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 328 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.78 (■), 2.58 (●) y 4.22 min (▲).



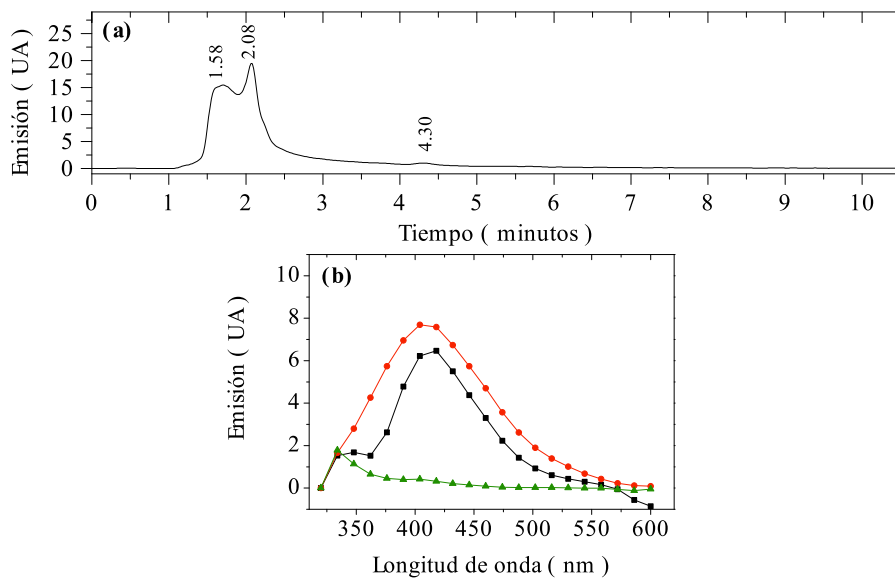
Inyección 3: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 305 nm; **(b)** espectros de emisión a 2.00 (■), 2.58 (●) y 4.22 min (▲).



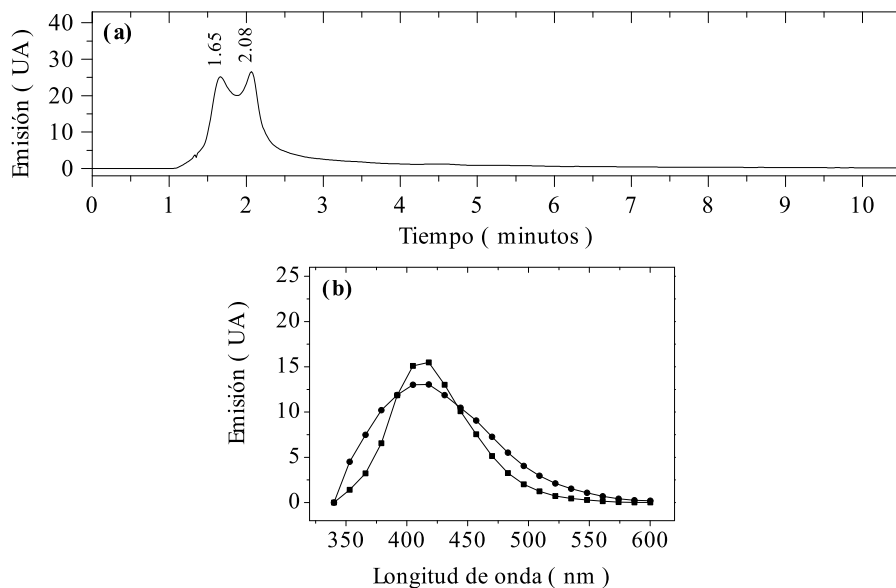
Inyección 4: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 353 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.78 (■), 3.72 (●) y 4.22 min (▲).



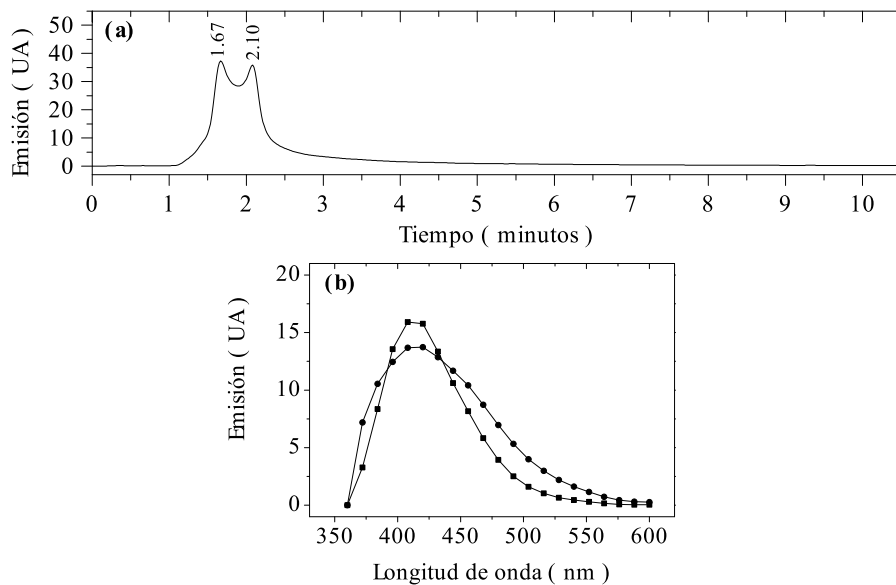
Inyección 5: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 305 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.58 (■), 2.08 (●) y 4.30 min (▲).



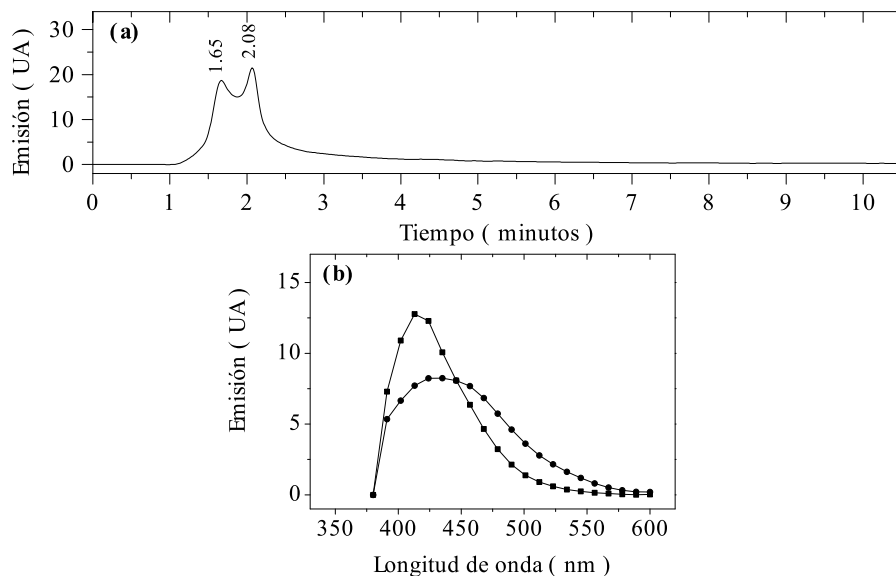
Inyección 6: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 444 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.65 (■) y 2.08 min (●).



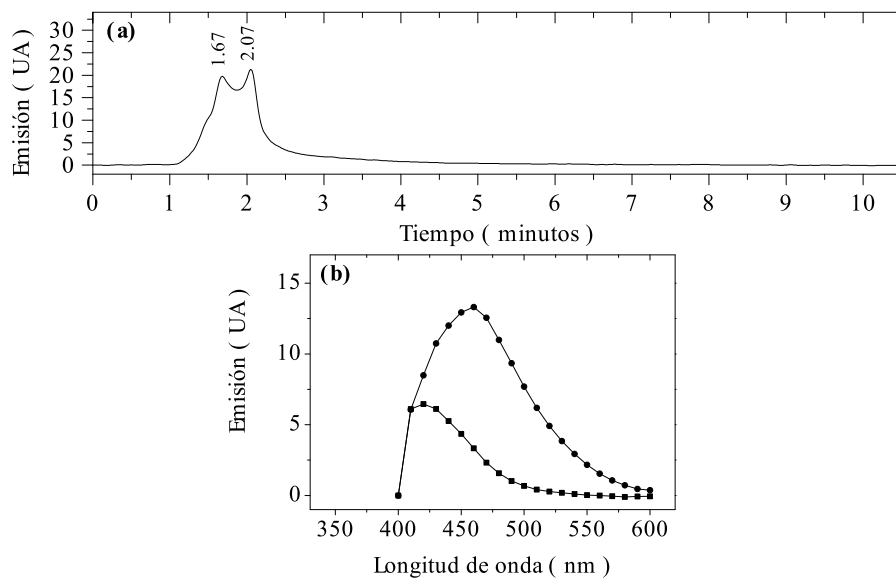
Inyección 7: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 420 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.67 (■) y 2.10 min (●).



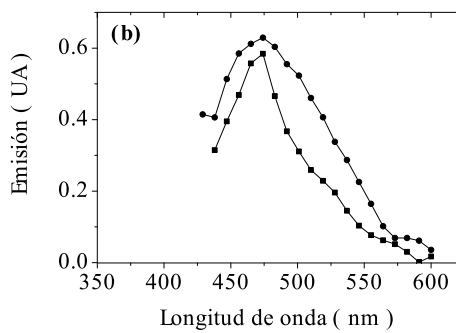
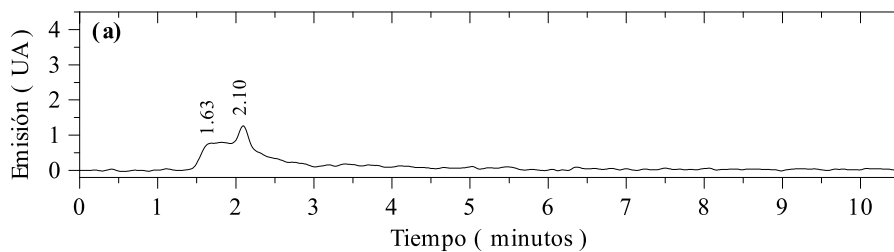
Inyección 8: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 446 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.65 (■) y 2.08 min (●).



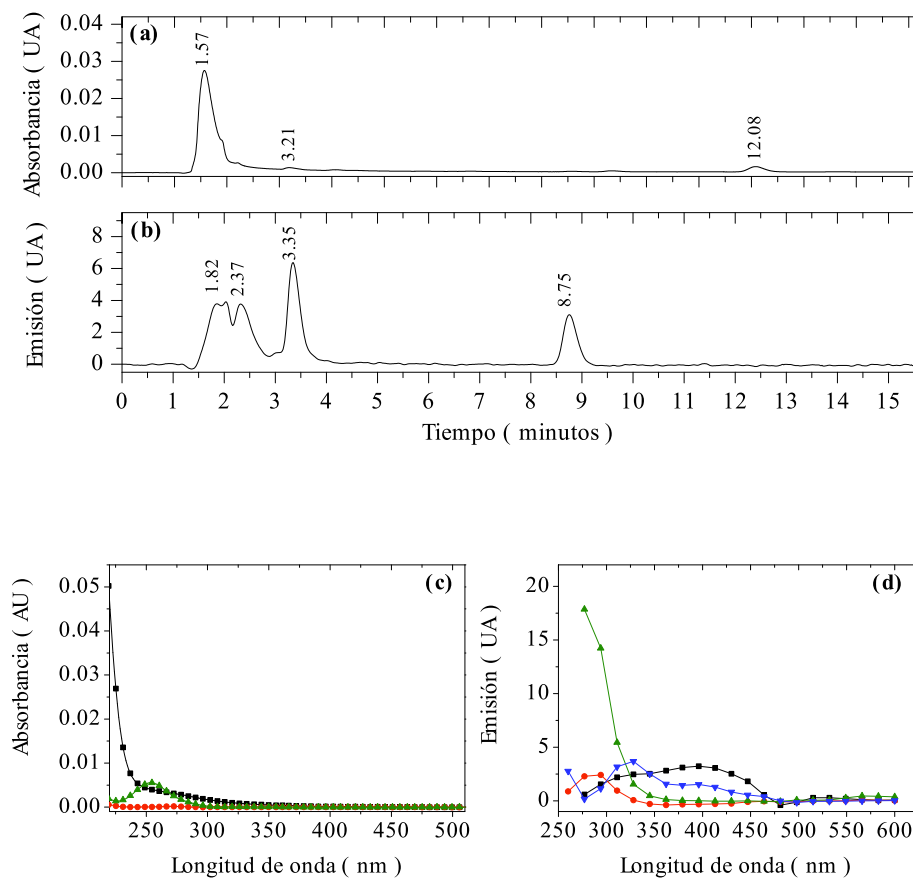
Inyección 9: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 420 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.67 (■) y 2.07 min (●).



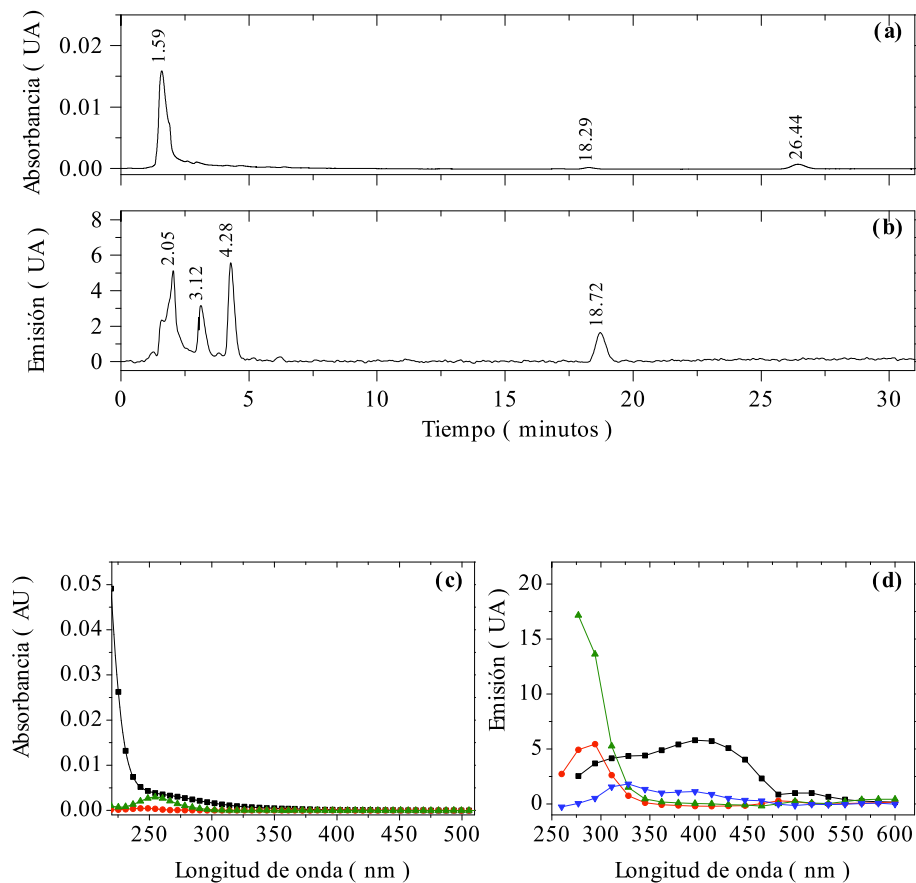
Inyección 10: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma emisión a 447 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.63 (■) y 2.10 min (●).



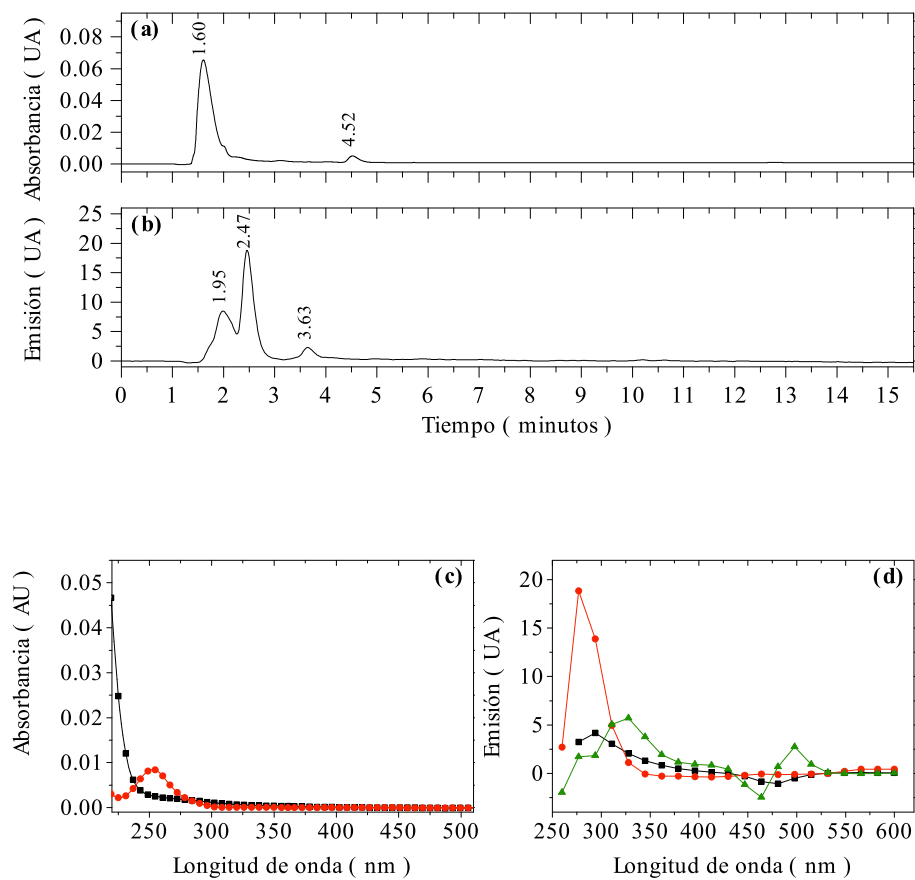
Inyección 11: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 225 nm y **(b)** emisión a 313 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.57 (■), 3.21 (●) y 12.08 min (▲), **(d)** emisión a 1.82 (■), 2.37 (●), 3.35 (▲) y 8.75 min (▼).



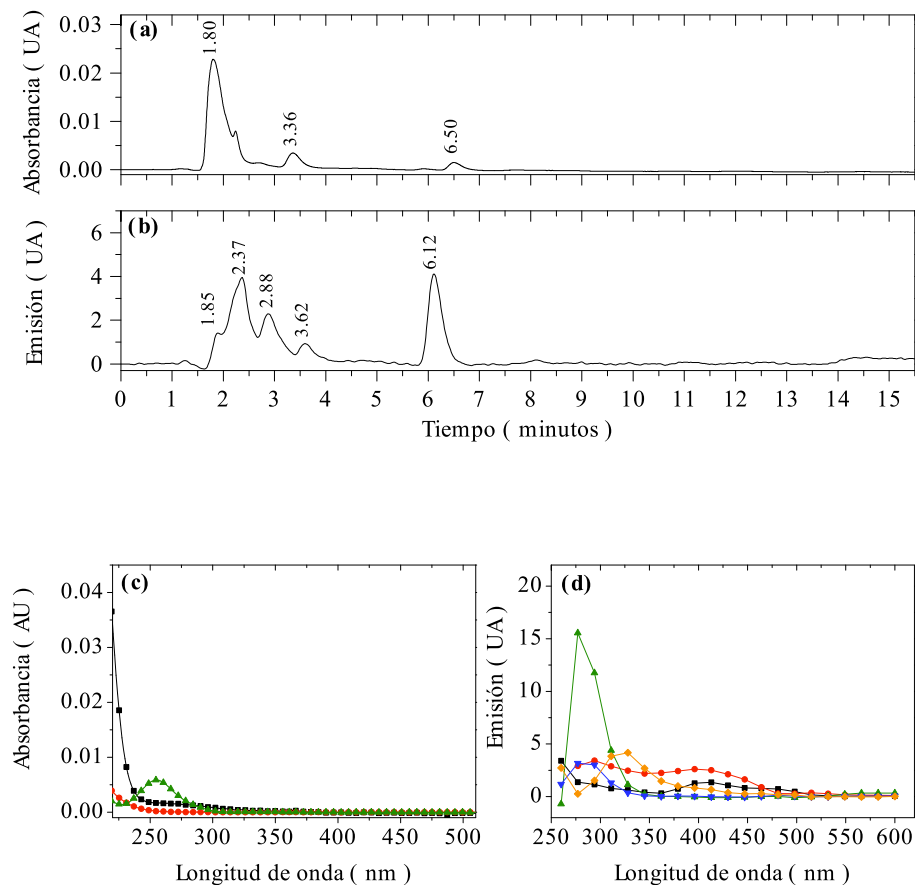
Inyección 12: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 230 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.59 (■), 18.29 (●) y 26.44 min(▲), **(d)** emisión a 2.05 (■), 3.12 (●), 4.28 (▲) y 17.72 min (▼).



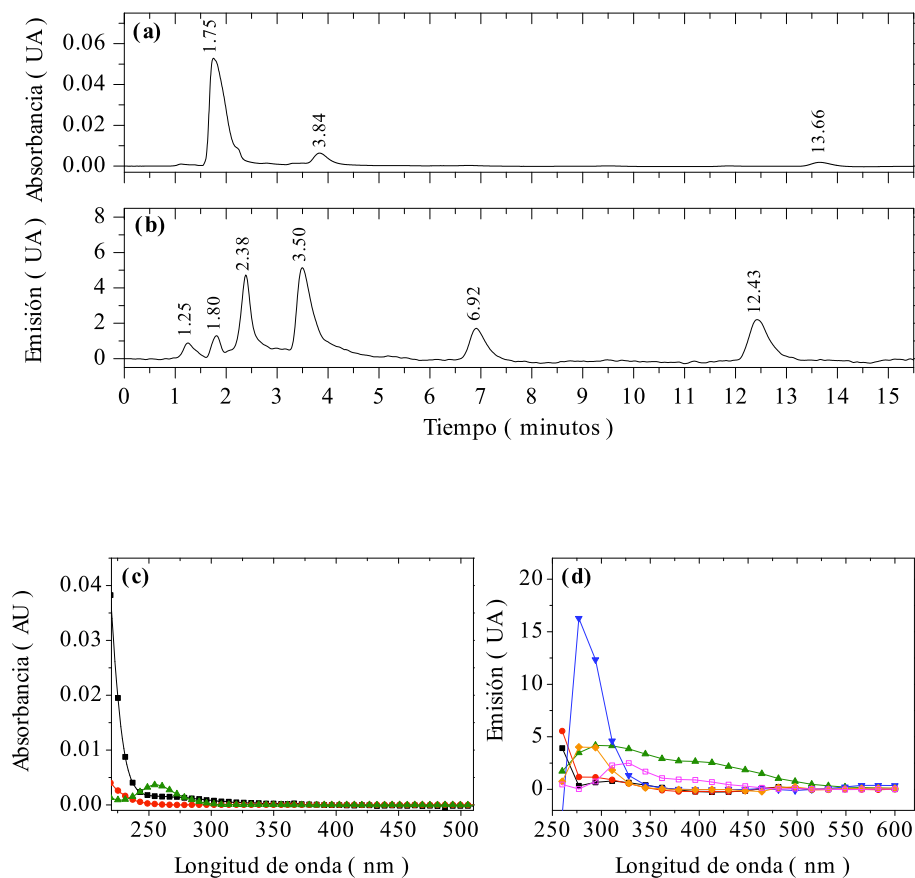
Inyección 13: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 215 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1,60 (■) y 4,52 min (●), **(d)** emisión a 1.95 (■), 2.47 (●) y 3.63 min (▲).



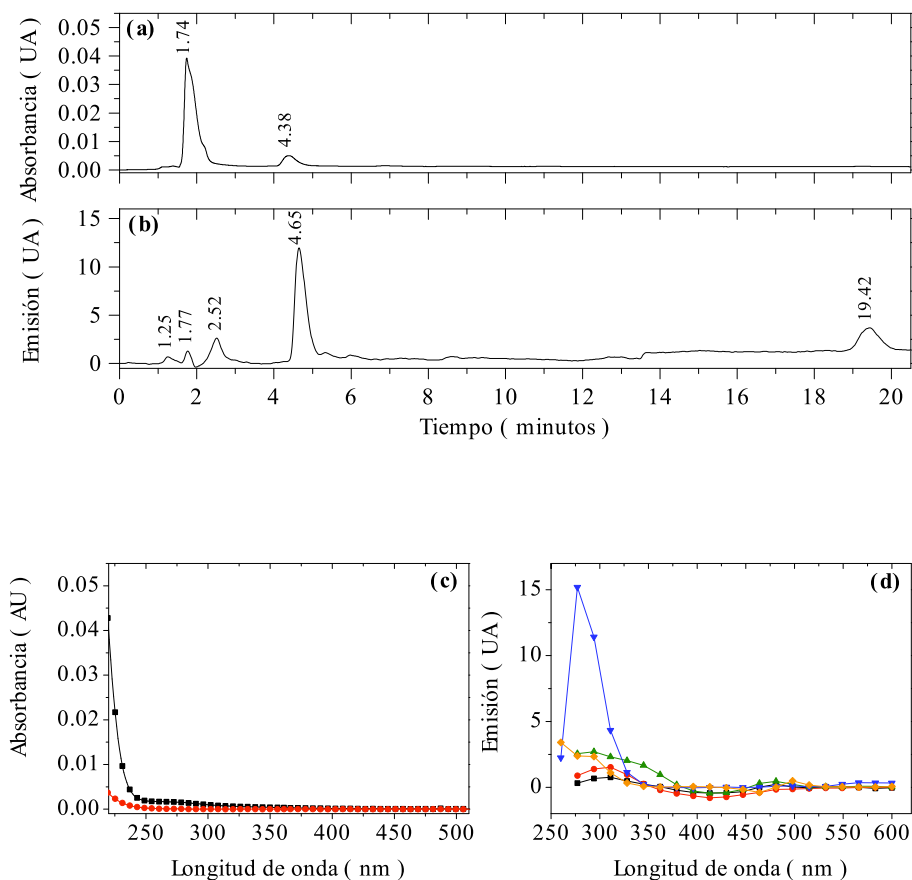
Inyección 14: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 224 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.80 (■), 3.36 (●) y 6.50 min (▲), **(d)** emisión a 1.85 (■), 2.37 (●), 2.88 (▲), 3.62 (▼) y 6.12 min (◆).



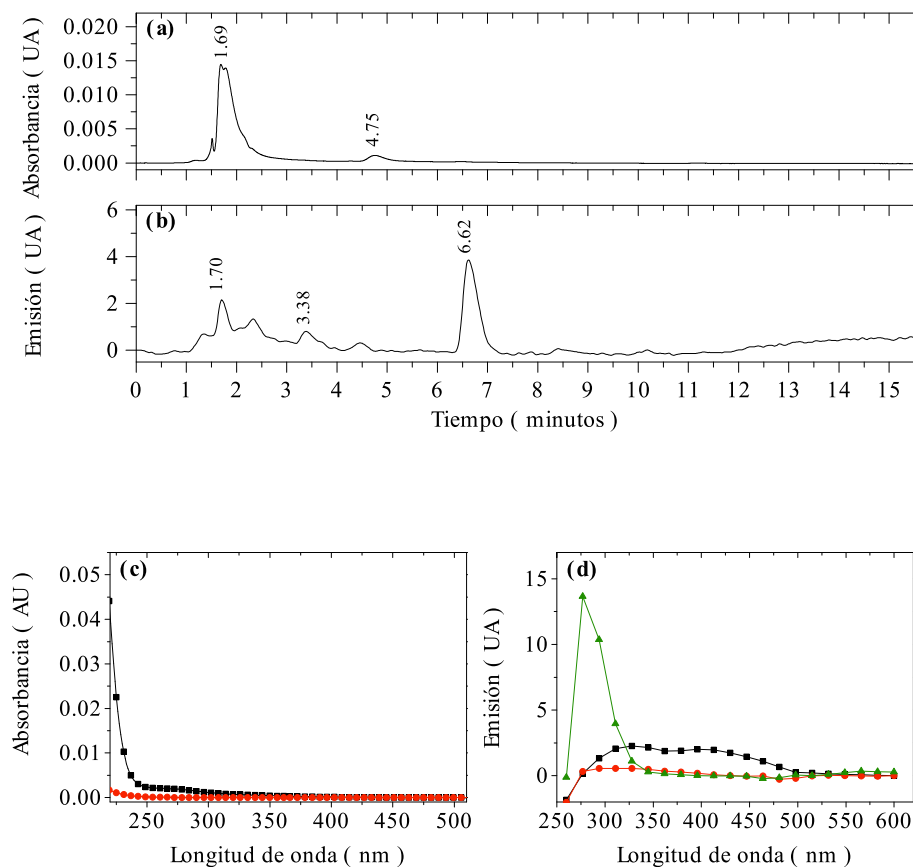
Inyección 15: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 215 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.75 (■), 3.84 (●) y 13.66 min (▲), **(d)** emisión a 1.25 (■), 1.80 (●), 2.38 (▲), 3.50 (▼), 6.92 (◆) y 13.43 min (□).



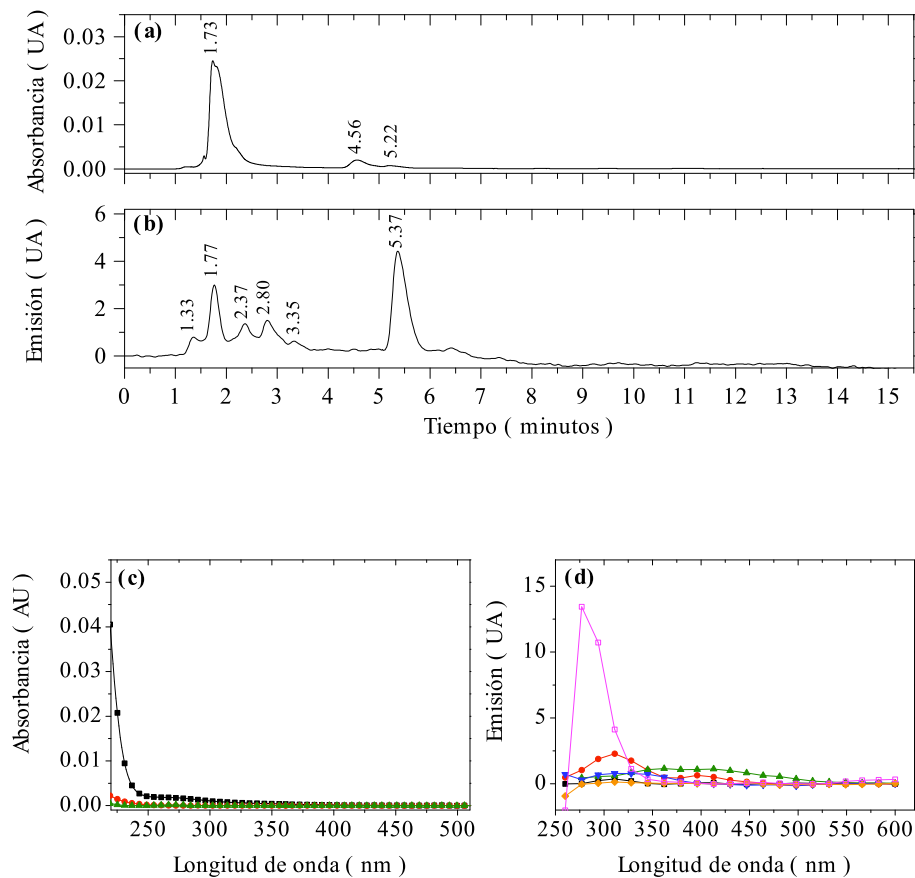
Inyección 16: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 294 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.74 (■) y 4.38 min (●), **(d)** emisión a 1.25 (■), 1.77 (●), 2.52 (▲), 4.65 (▼) y 19.42 min (◆).



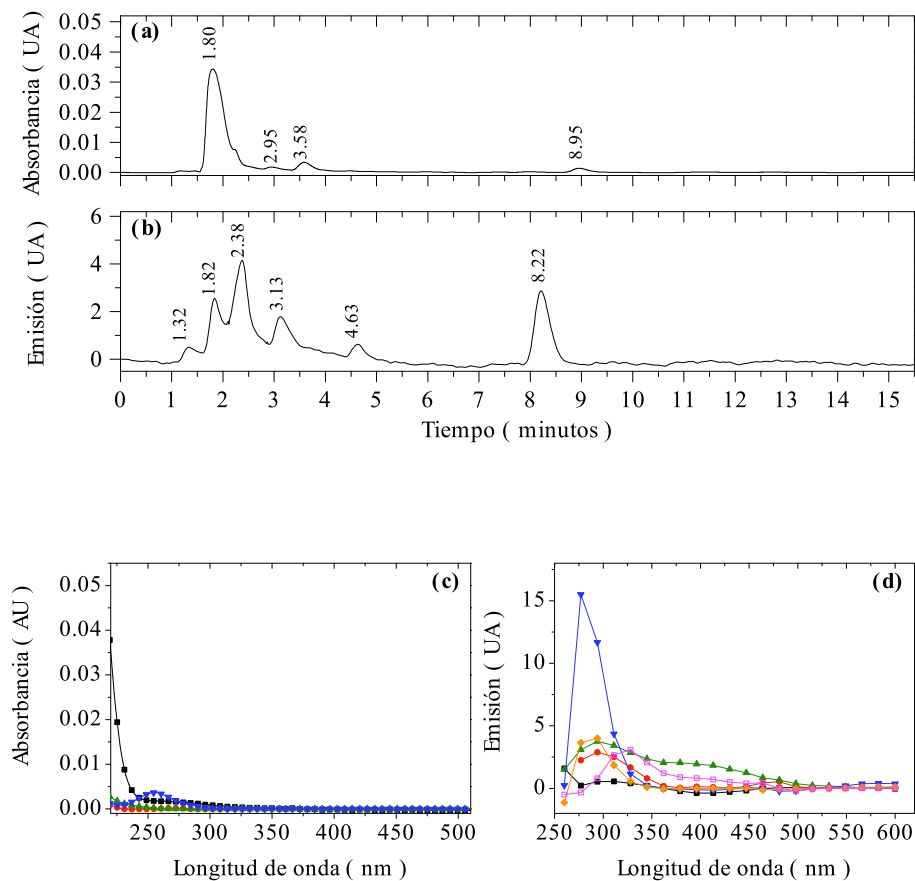
Inyección 17: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 228 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.69 (■) y 4.75 min (●), **(d)** emisión a 1.70 (■), 3.38 (●) y 6.62 min (▲).



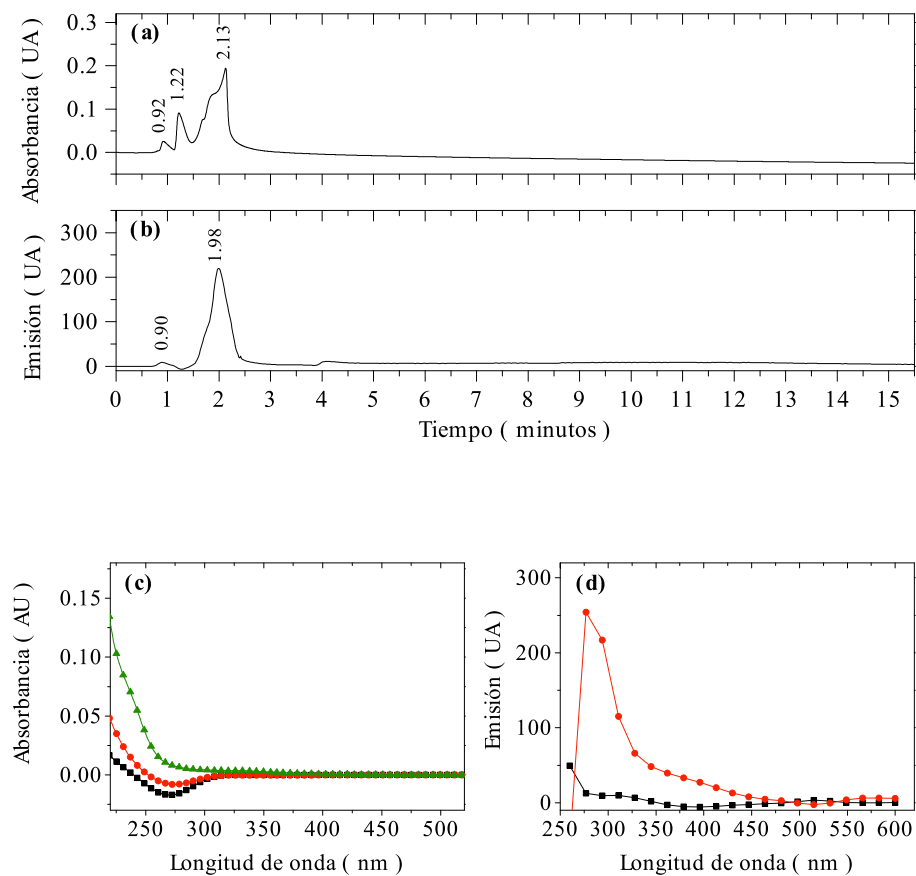
Inyección 18: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 224 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.73 (■), 4.56 (●) y 5.22 min (▲), **(d)** emisión a 1.33 (■), 1.77 (●), 2.37 (▲), 2.80 (▼), 3.35 (◆) y 5.37 min (□).



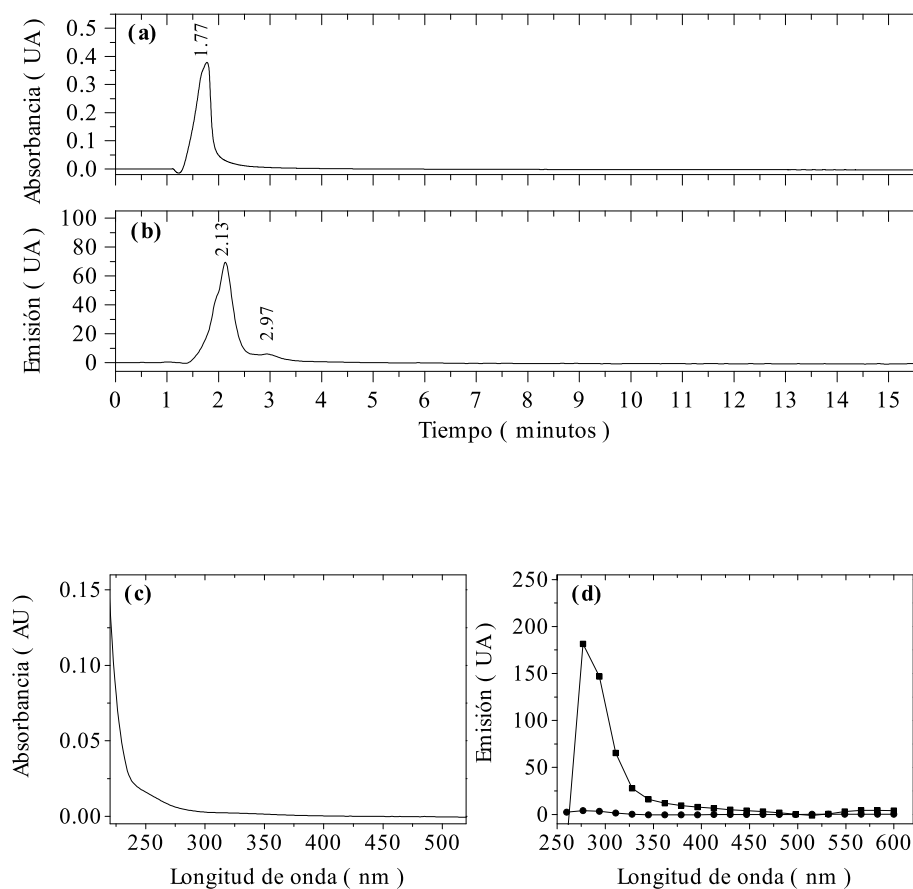
Inyección 19: Muestra, columna analítica C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 328 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.80 (■), 2.95 (●), 3.58 (▲) y 8.95 min (▼), **(d)** emisión a 1.32 (■), 1.82 (●), 2.38 (▲), 3.13 (▼), 4.63 (◆) y 8.22 min (◻).



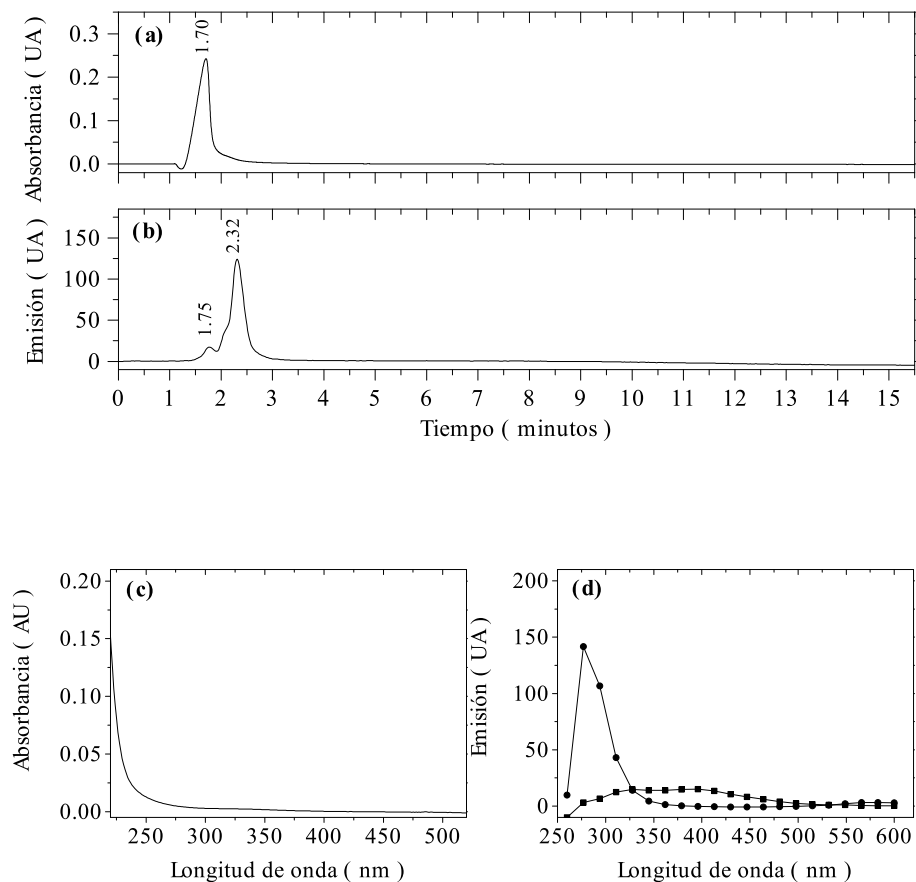
Inyección 20: Muestra, columna analítica NH2. Cromatogramas de **(a)** absorción a 215 nm y **(b)** emisión a 294 nm; espectros de **(c)** absorción a 0.92 (■), 1.22 (●) y 2.13 min (▲), **(d)** emisión a 0.90 (■) y 1.98 min (●).



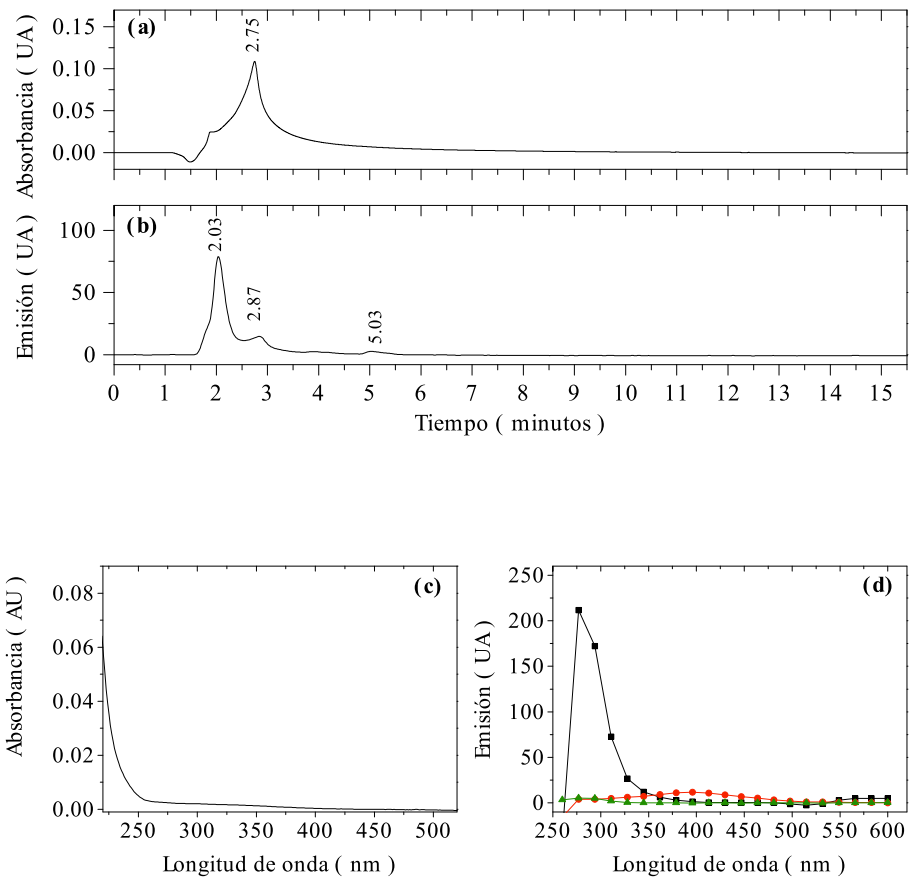
Inyección 21: Muestra, columna analítica NH₂. Cromatogramas de **(a)** absorción a 210 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.77min, **(d)** emisión a 2.13 (■) y 2.97 min (●).



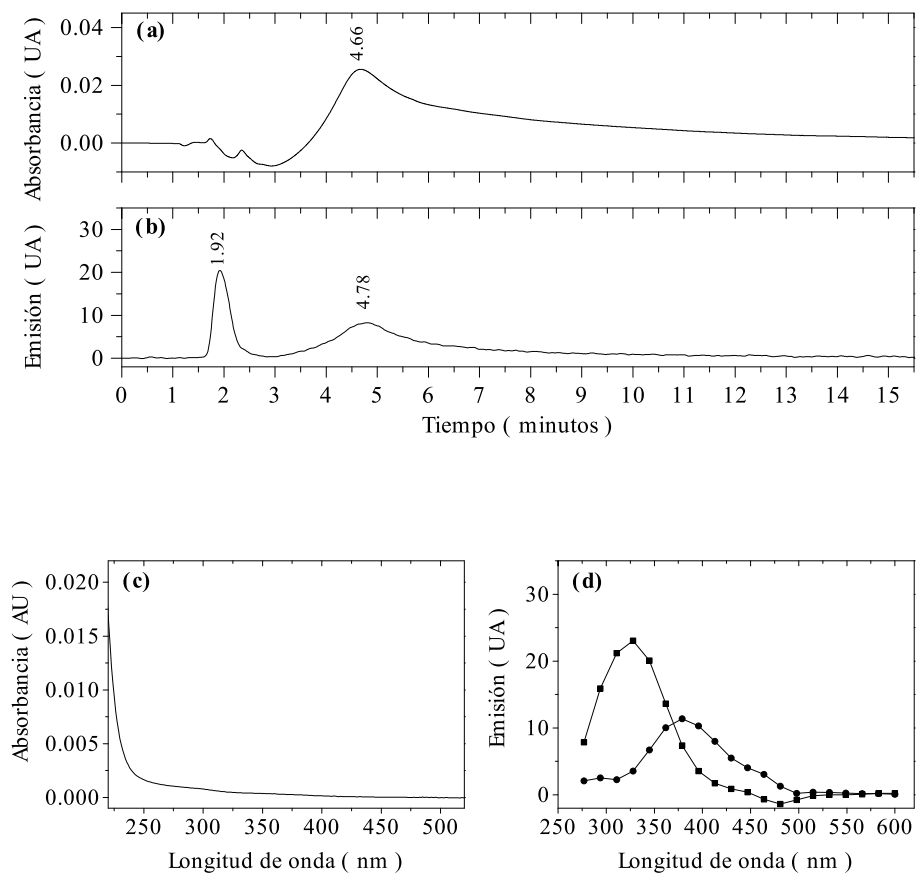
Inyección 22: Muestra, columna analítica NH2. Cromatogramas de **(a)** absorción a 215 nm y **(b)** emisión a 294 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.70 min, **(d)** emisión a 1.75 (■) y 2.13 min (●).



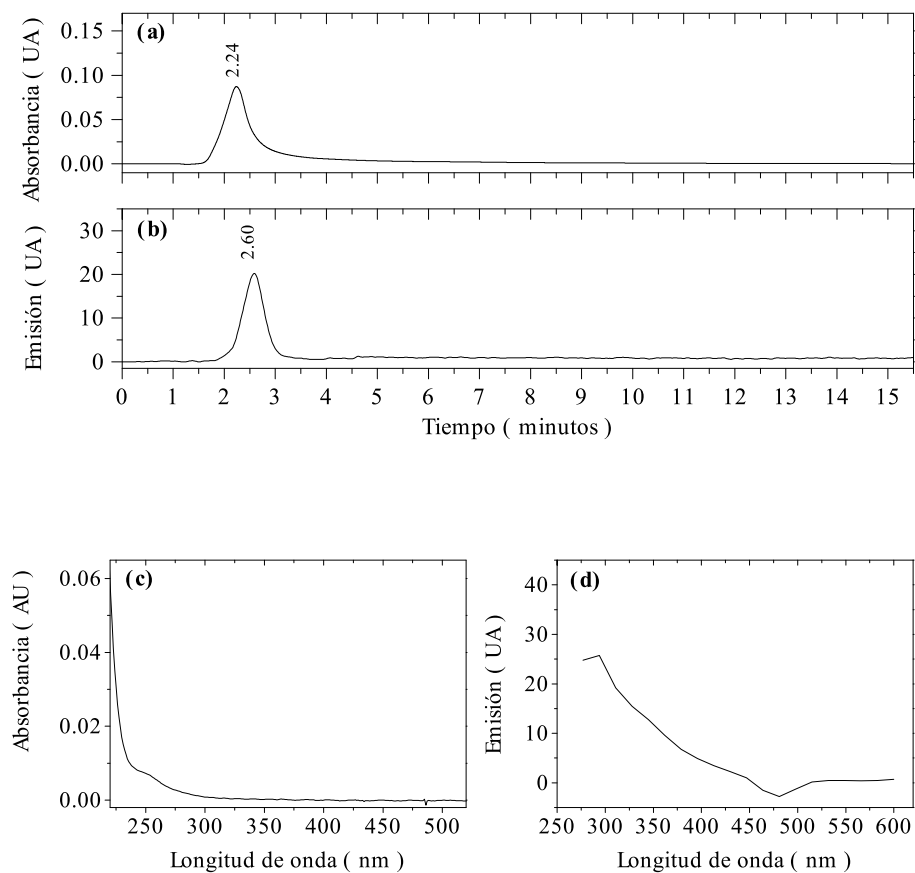
Inyección 23: Muestra, columna analítica NH2. Cromatogramas de **(a)** absorción a 214 nm y **(b)** emisión a 315 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.75 min, **(d)** emisión a 2.03 (■), 2.87 (●) y 5.03 min (▲).



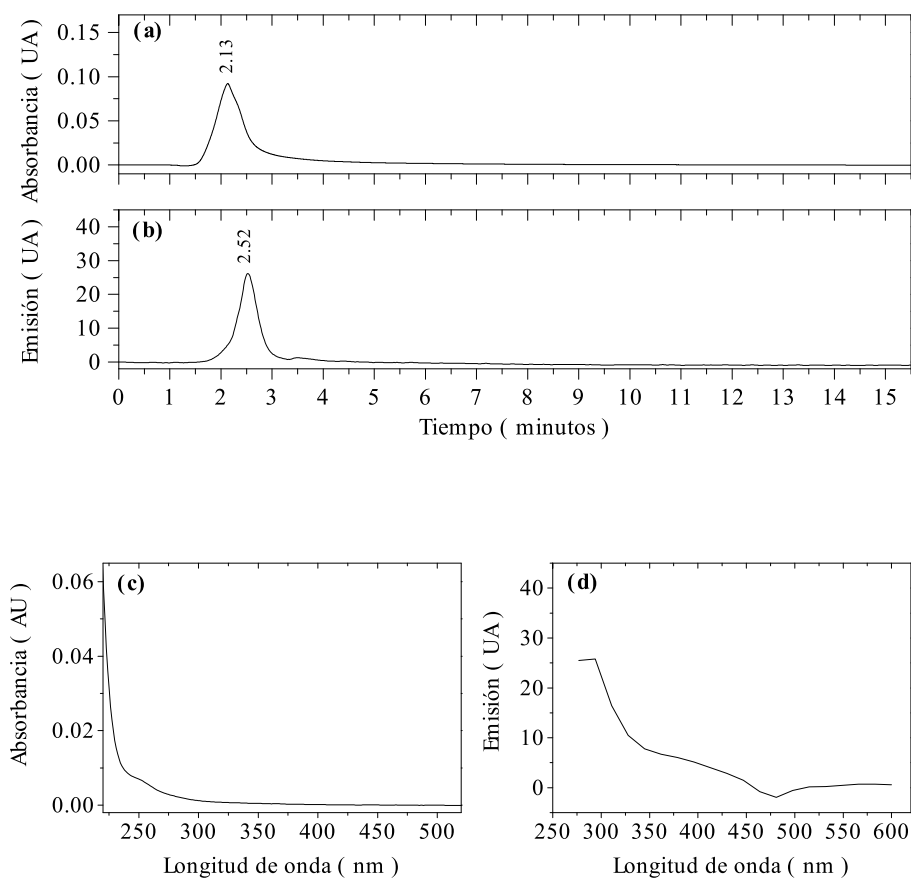
Inyección 24: Muestra, columna analítica NH₂. Cromatogramas de **(a)** absorción a 214 nm y **(b)** emisión a 345 nm; espectros de **(c)** absorción a 4.66 min, **(d)** emisión a 1.92 (■) y 4.78 min (●).



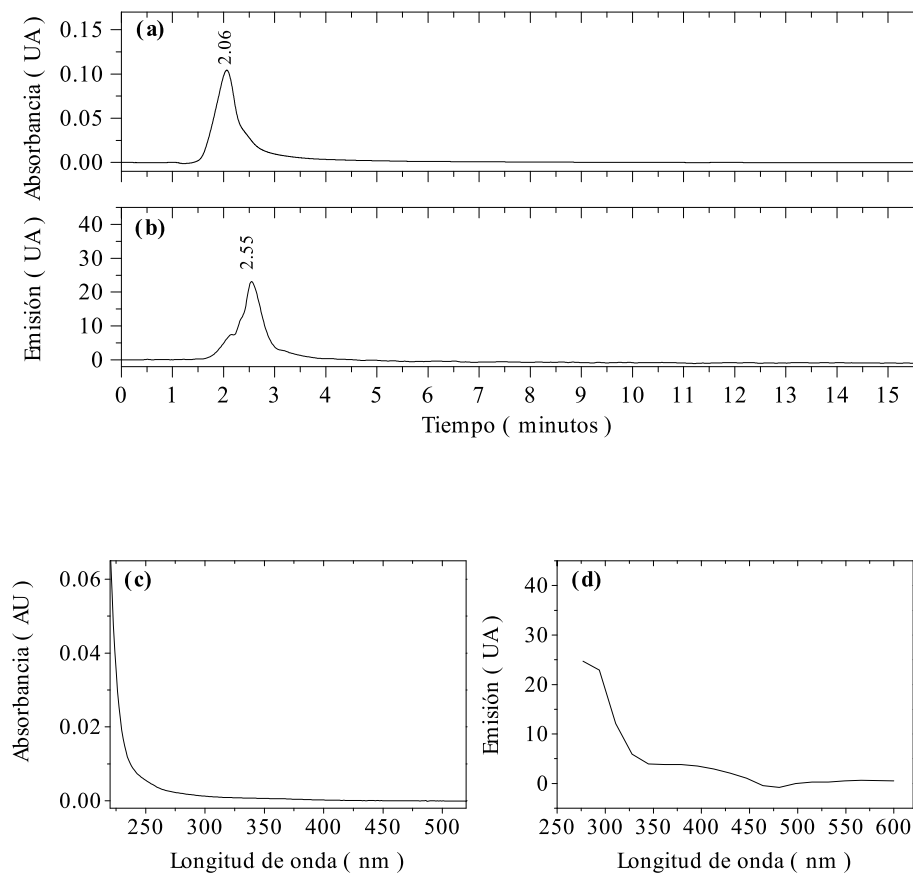
Inyección 25: Muestra, columna analítica NH₂. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 311 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.24 min, **(d)** emisión a 2.60 min.



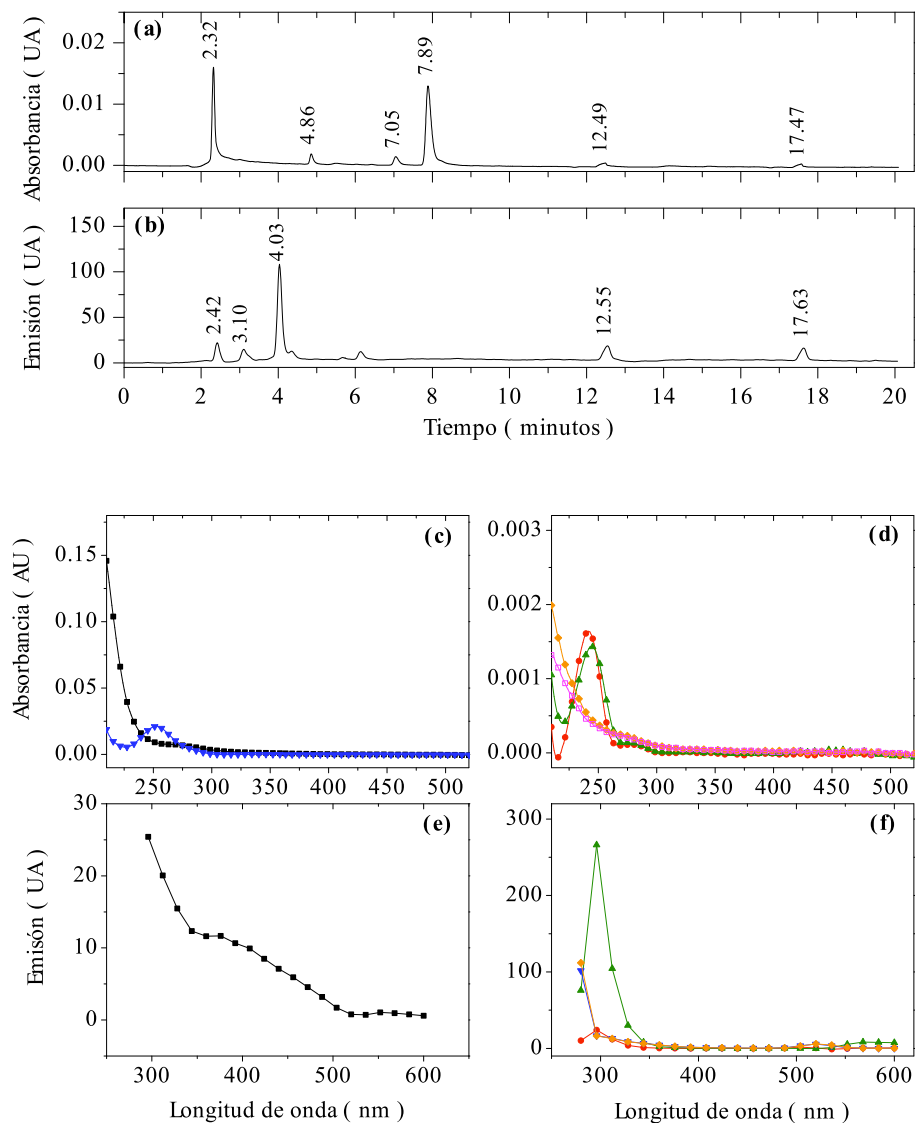
Inyección 26: Muestra, columna analítica NH2. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 294 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.13 min, **(d)** emisión a 2.52 min.



Inyección 27: Muestra, columna analítica NH2. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 294 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.06 min, **(d)** emisión a 2.55 min.



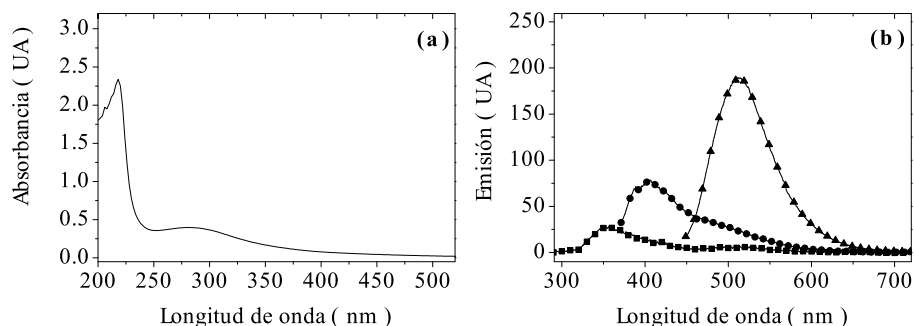
Inyección 28: Muestra, columna preparativa C18. Cromatogramas de **(a)** absorción a 239 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** y **(d)** absorción a 2.32 (■), 4.86 (●), 7.05 (▲), 7.89 (▼), 12.49 (◆) y 17.57 min (□), **(e)** y **(f)** emisión a 2.42 (■), 3.10 (●), 4.03 (▲), 12.55 (▼) y 17.63 min (◆).



CuCLsH1

Muestra de clústeres de cobre sintetizada por Noelia Vilar mediante un método electroquímico conTBAAc como electrolito soporte.

Muestra inicial: (a) Espectro de absorción y (b) espectros de emisión excitando a 230 (■), 350 (●) y 430 nm (▲).



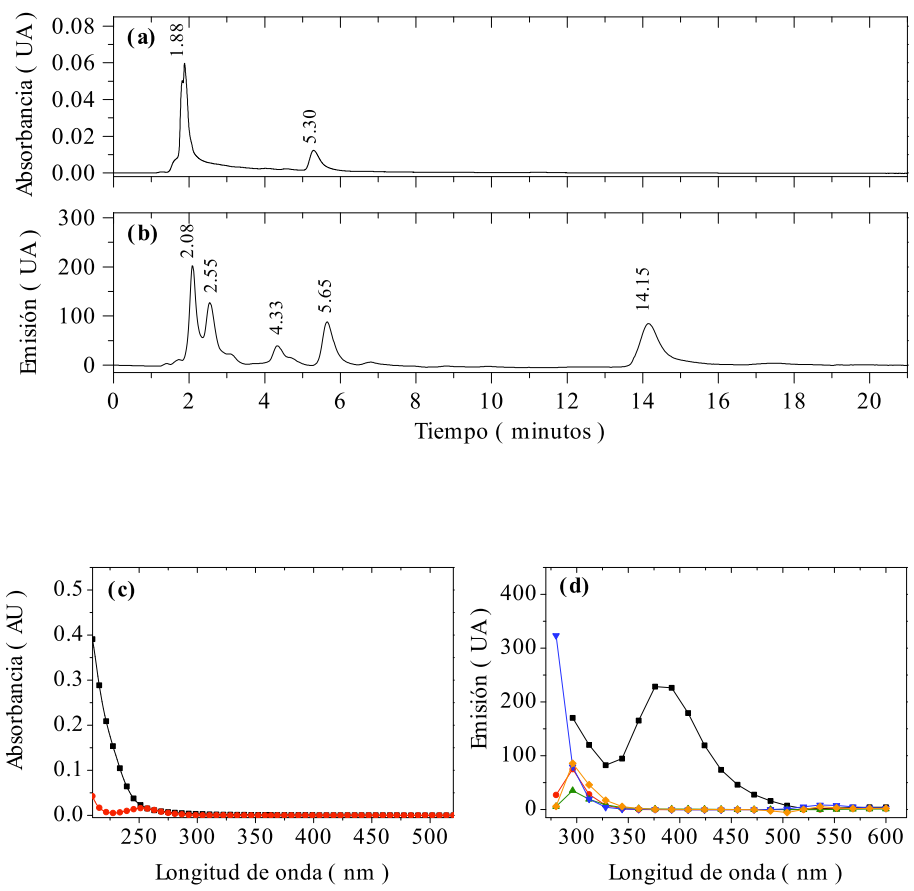
Inyecciones: Resumen de las inyecciones y condiciones de elución de la muestra CuCLsH1, fase reversa, columna C18, acoplada a una precolumna del mismo relleno, detector absorbancia y fluorescencia.

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
1	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
2	10	1	80:20 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
3	10	1	90:10 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
4	10	1	70:30 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
5	10	1	50:50 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
6	10	1	45:55 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600

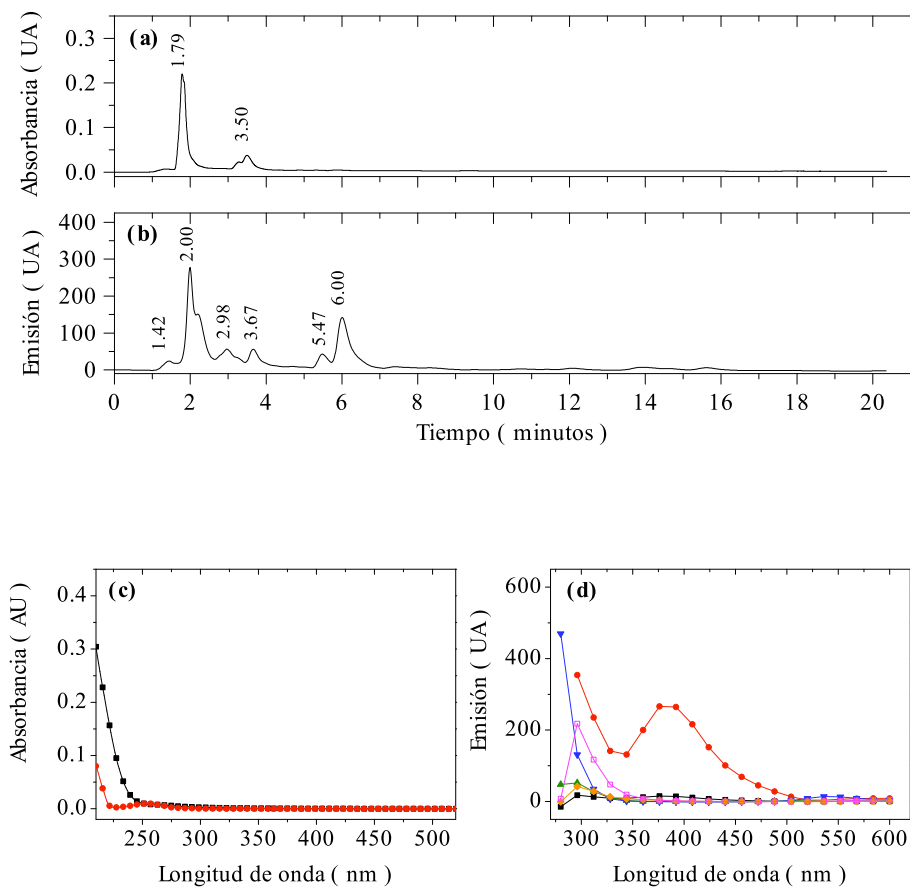
	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
7	10	1	40:60 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600
8	10	1	40:60 MeOH:H ₂ O	270	barrido 280-600
9	10	1	50:50 MeOH:H ₂ O	270	barrido 280-600
10	10	1	70:30 MeOH:H ₂ O	270	barrido 280-600
11	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	270	barrido 280-600
12	10	1	90:10 MeOH:H ₂ O	270	barrido 280-600
13	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	230	barrido 240-600
14	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	250	barrido 260-600
15	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	290	barrido 300-600
16	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	310	barrido 320-600
17	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	330	barrido 340-600
18	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	350	barrido 360-600
19	10	1	80:20 MeOH:H ₂ O	370	barrido 380-600

Parte experimental

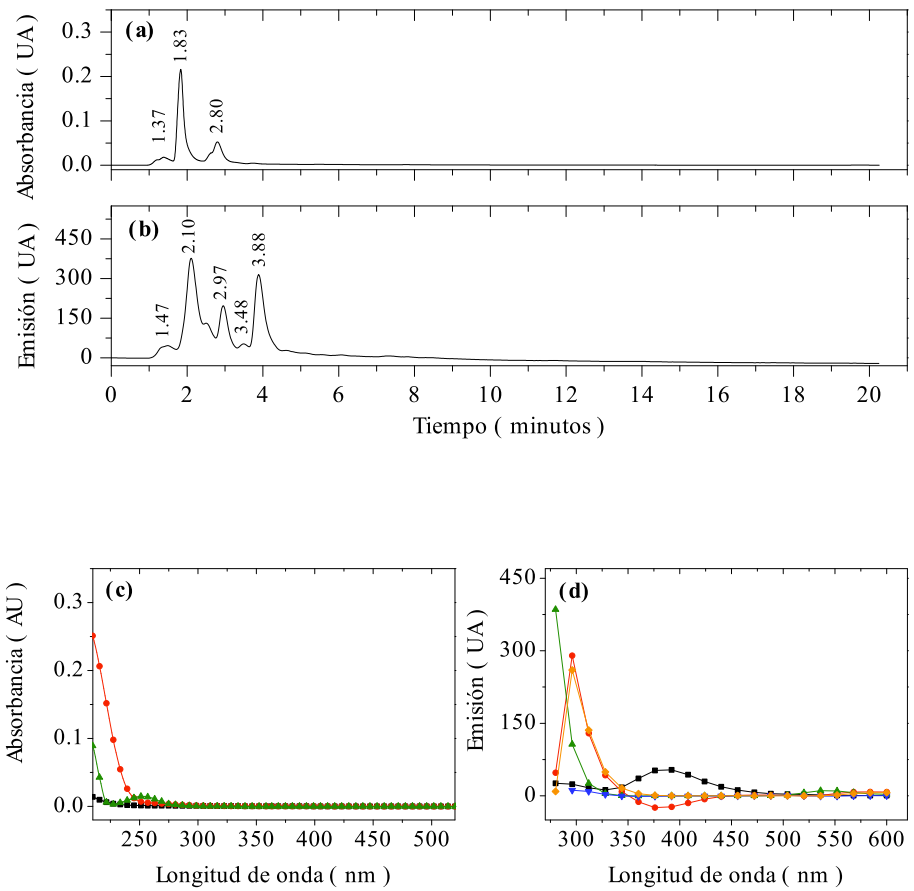
Inyección 1: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 240 nm y **(b)** emisión a 296 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.88 (■) y 5.30 min (●), **(d)** emisión a 2.08 (■), 2.55 (●), 4.33 (▲), 5.65 (▼) y 14.15 min (◆).



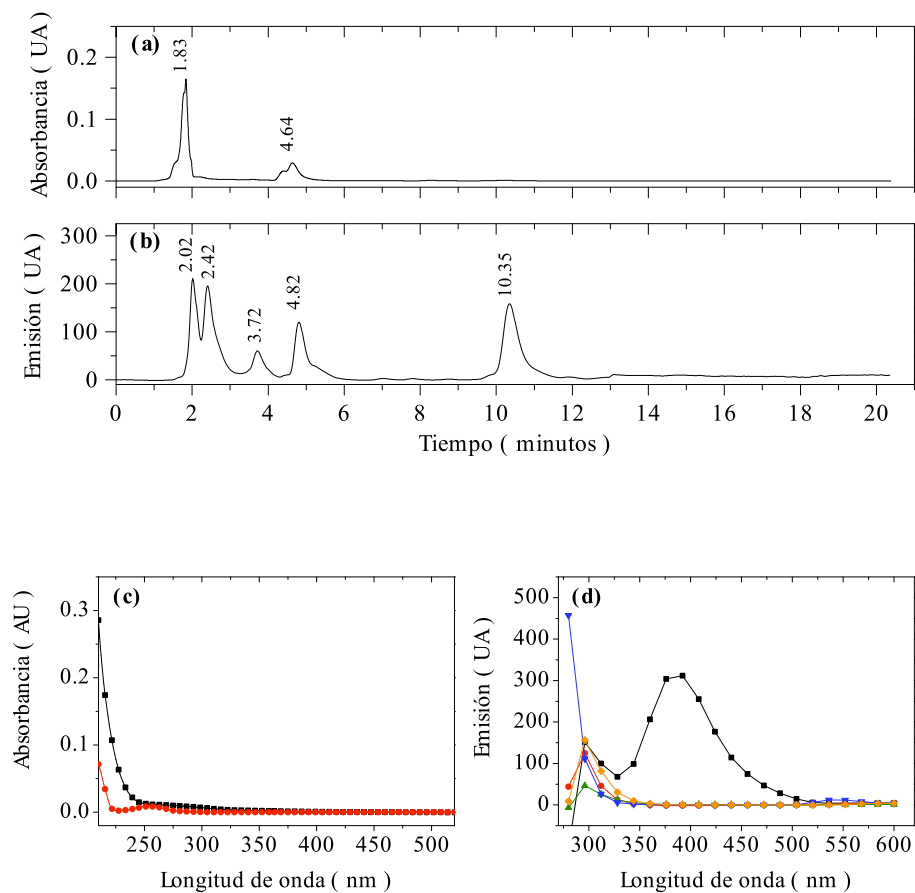
Inyección 2: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.79 (■) y 3.50 min(●), **(d)** emisión a 1.42 (■), 2.00 (●), 2.98 (▲), 3.67 (▼), 5.47 (◆) y 6.00 min (◻).



Inyección 3: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 215 nm y **(b)** emisión a 296 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.37 (■), 1.83 (●) y 2.80 min (▲), **(d)** emisión a 1.47 (■), 2.10 (●), 2.97 (▲), 3.48 (▼) y 3.88 min (◆).

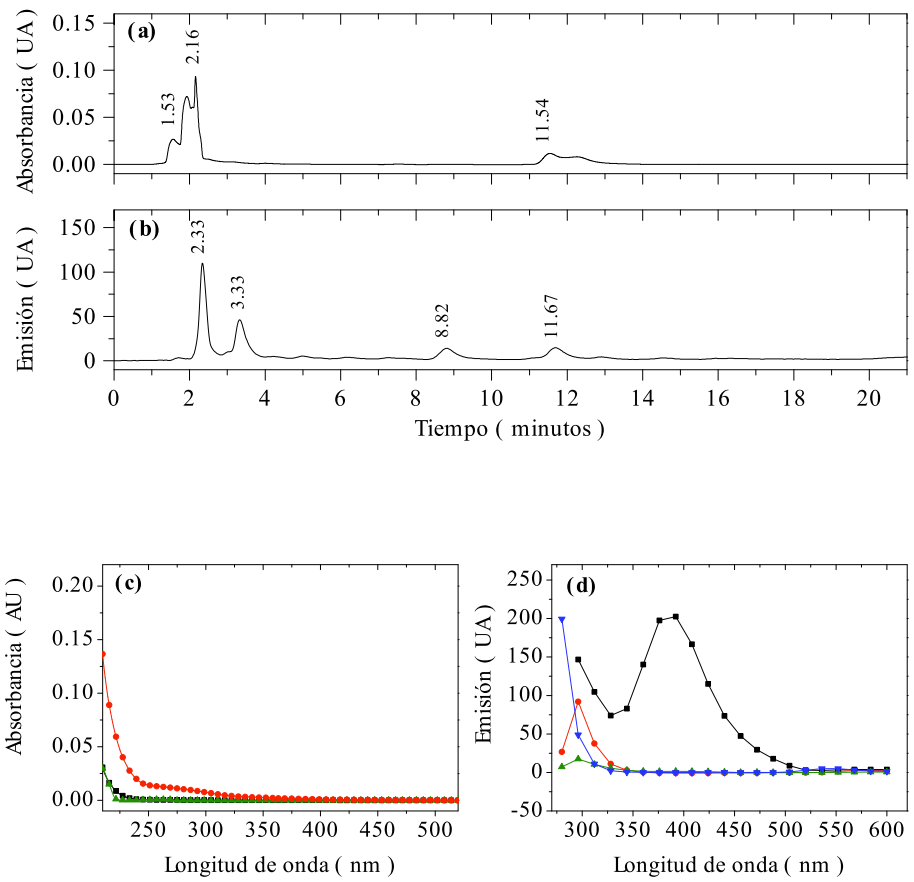


Inyección 4: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 296 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.83 (■) y 4.64 min (●), **(d)** emisión a 1.47 (■), 2.02 (●), 2.42 (▲), 3.72 (▼), 4.82 (◆) y 10.35 min (□).

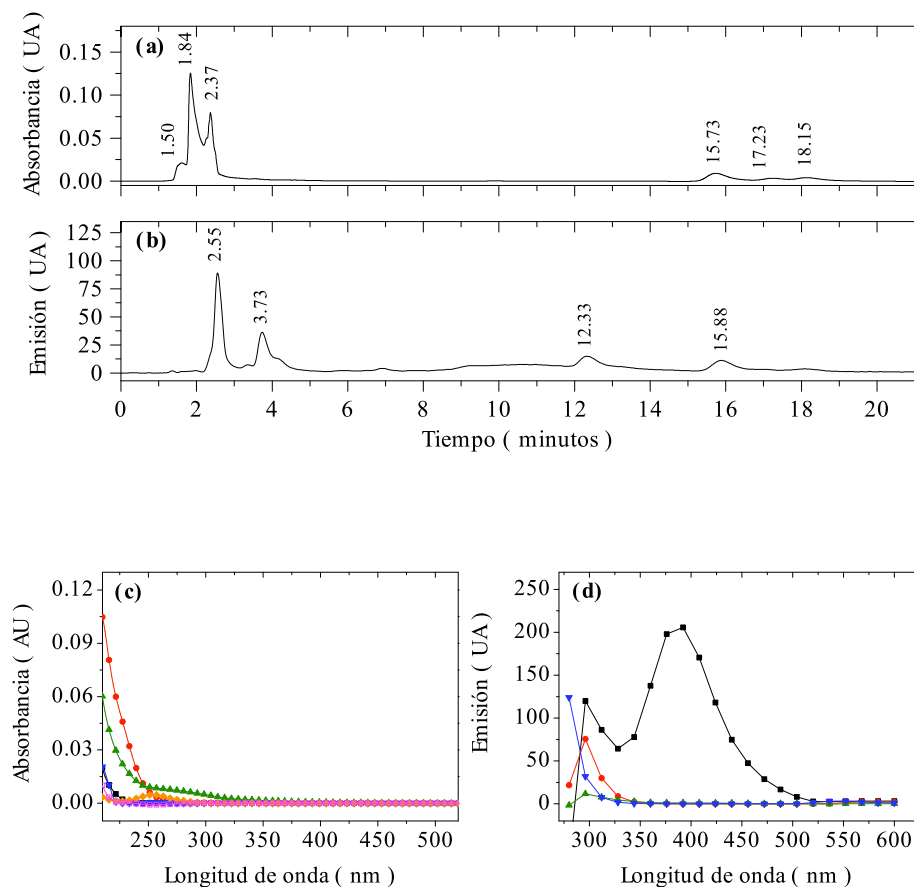


Parte experimental

Inyección 5: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.53 (■), 2.16 (●) y 11.53 min (▲), **(d)** emisión a 2.33 (■), 3.33 (●), 8.82 (▲) y 11.67 min (▼).

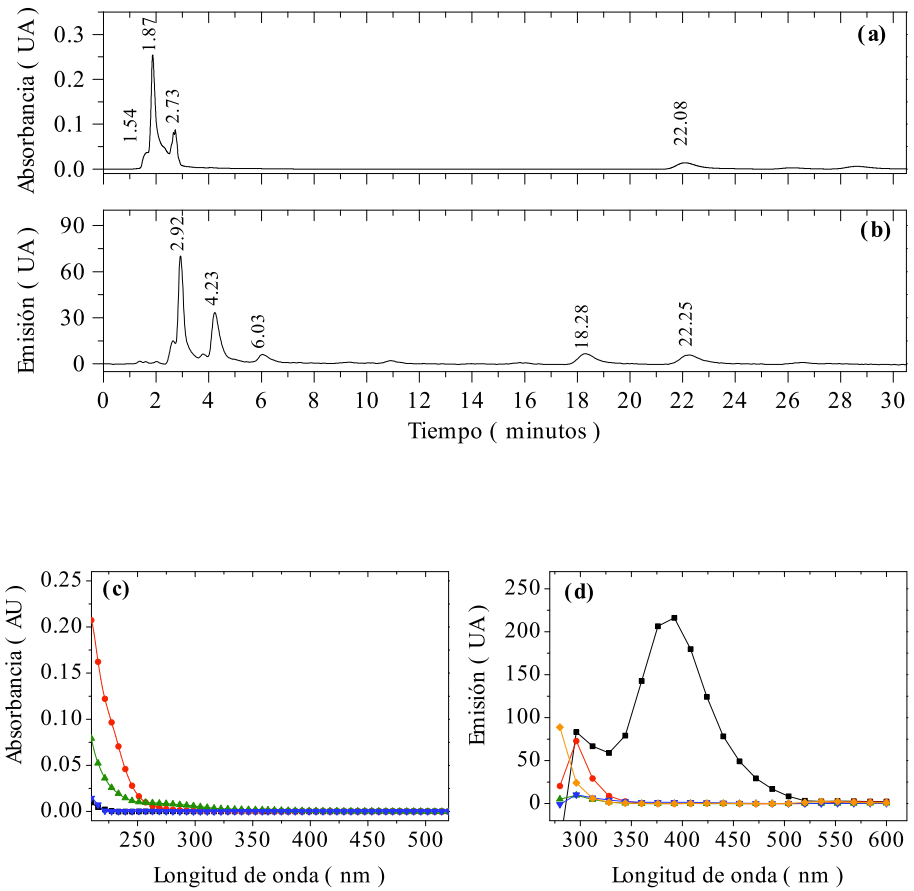


Inyección 6: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.50 (■), 1.84 (●), 2.37 (▲), 15.73 (▼), 17.23 (◆) y 18.15 min (□), **(d)** emisión a 2.55 (■), 3.73 (●), 12.33 (▲) y 15.88 min (▼).

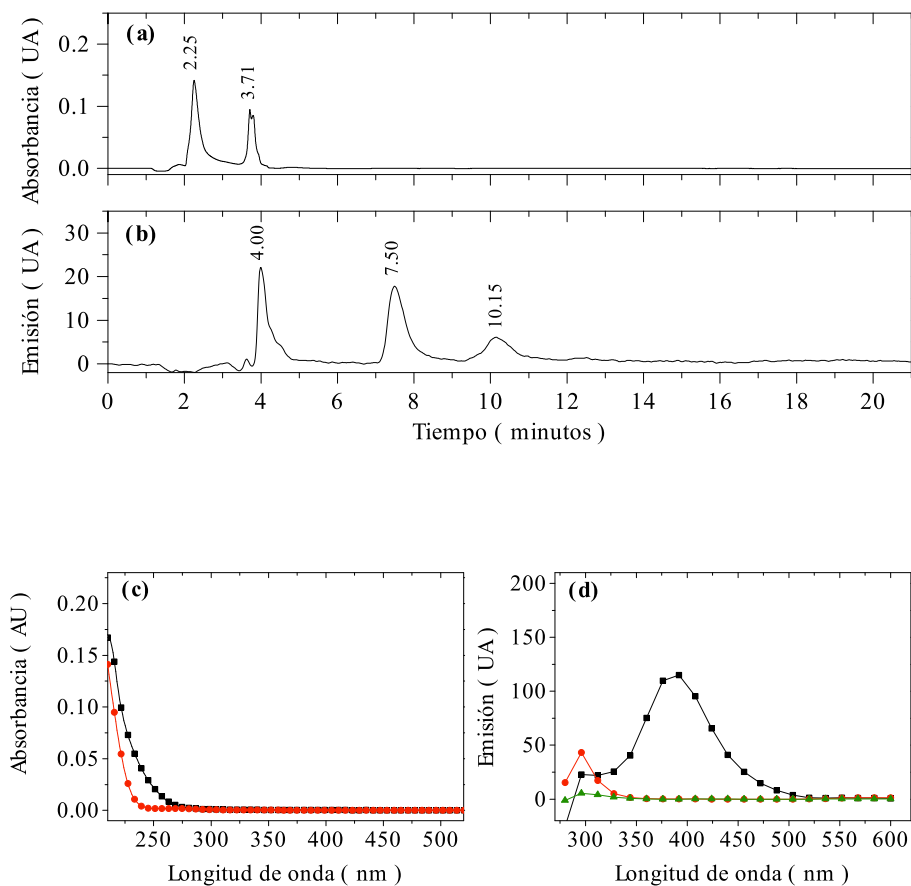


Parte experimental

Inyección 7: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 212 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.54 (■), 1.87 (●), 2.73 (▲) y 22.08 min, **(d)** emisión a 2.92 (■), 4.23 (●), 6.03 (▲), 18.28 (▼) y 22.25 min (◆).

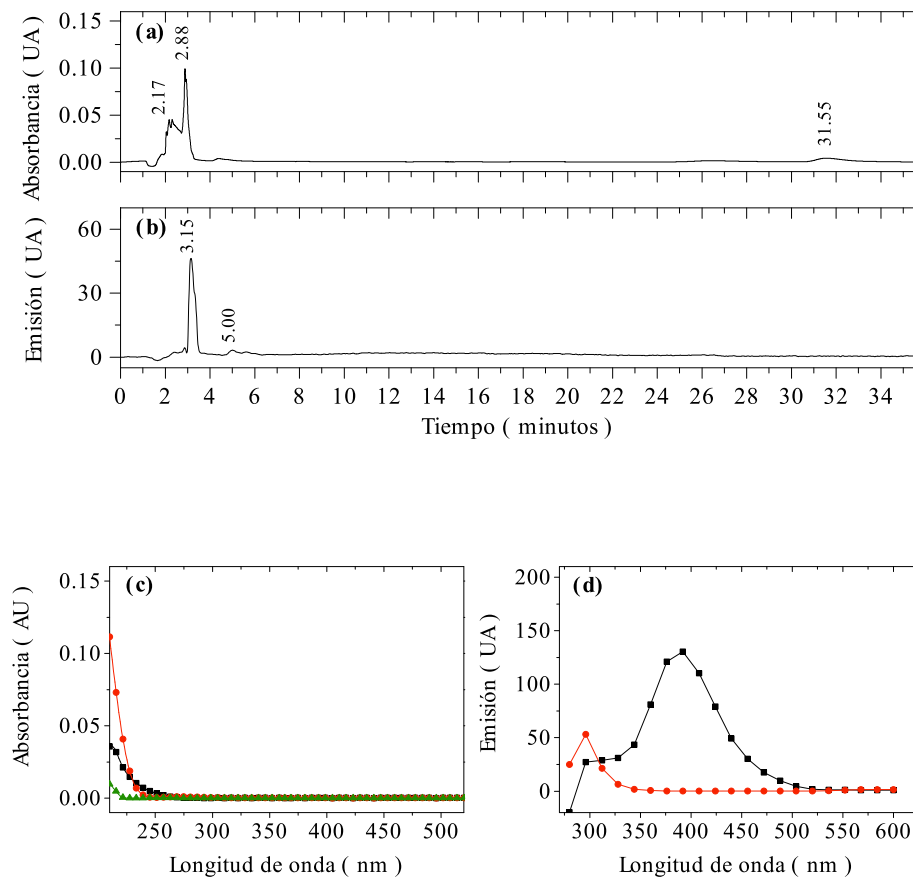


Inyección 8: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.25 (■) y 3.71 min (●), **(d)** emisión a 4.00 (■), 7.50 (●) y 10.15 min (▲).

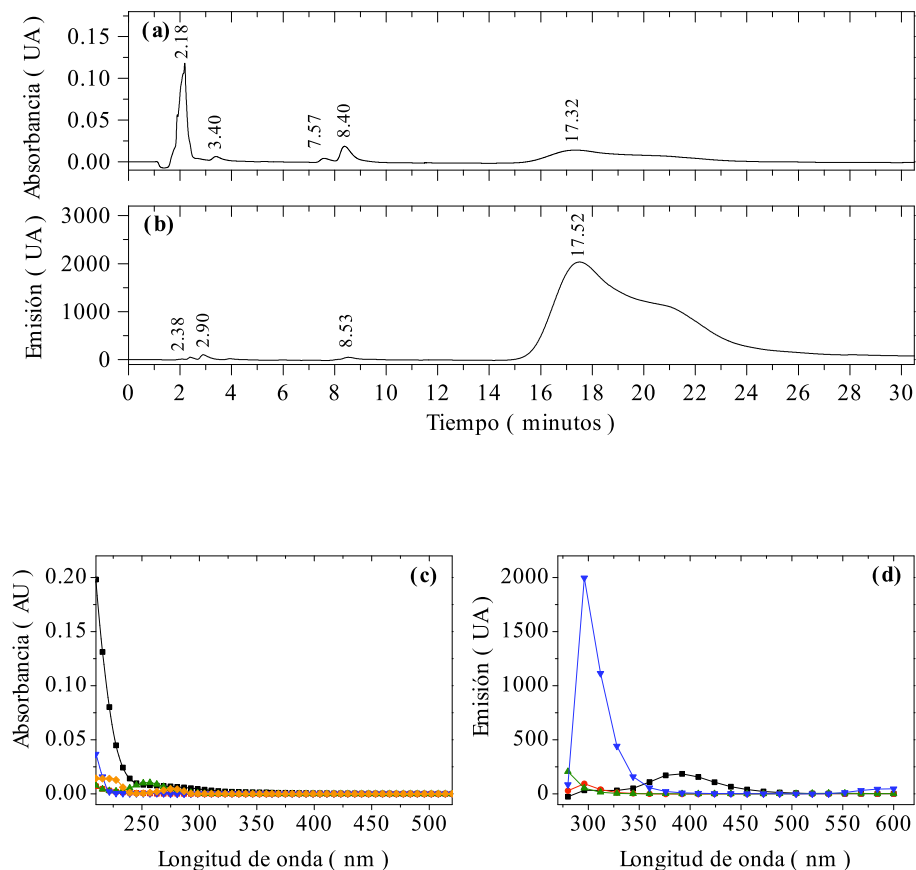


Parte experimental

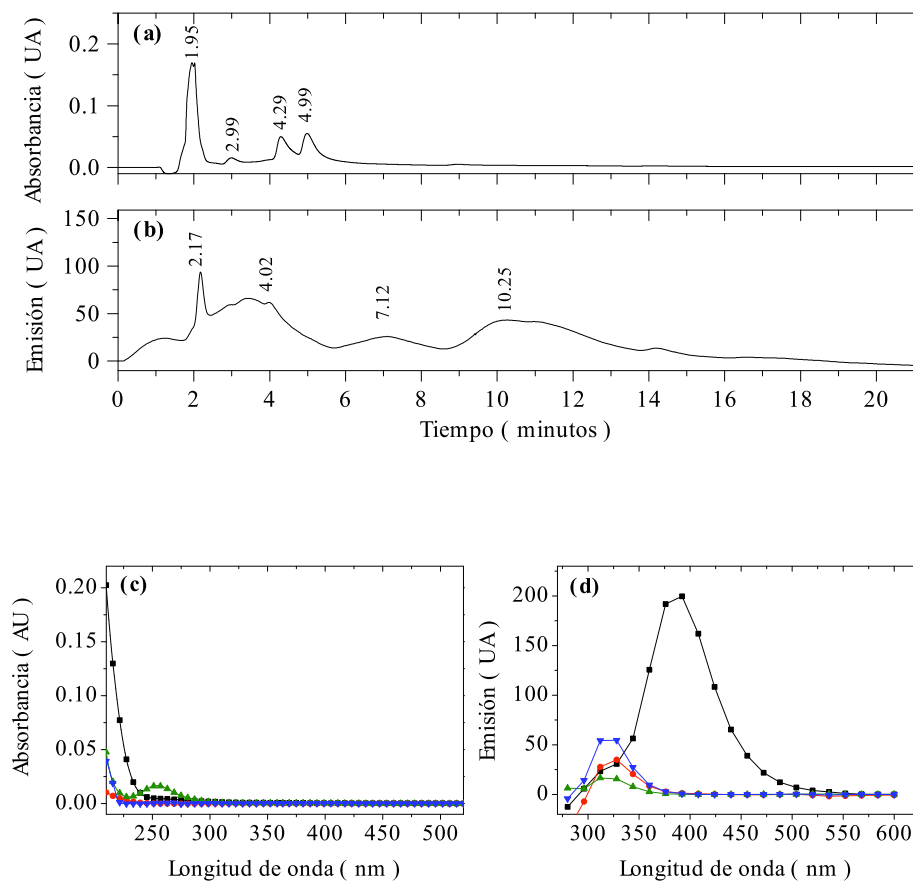
Inyección 9: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 344 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.17 (■), 2.88 (●) y 31.55 min (▲), **(d)** emisión a 3.15 (■) y 5.00 min (●).



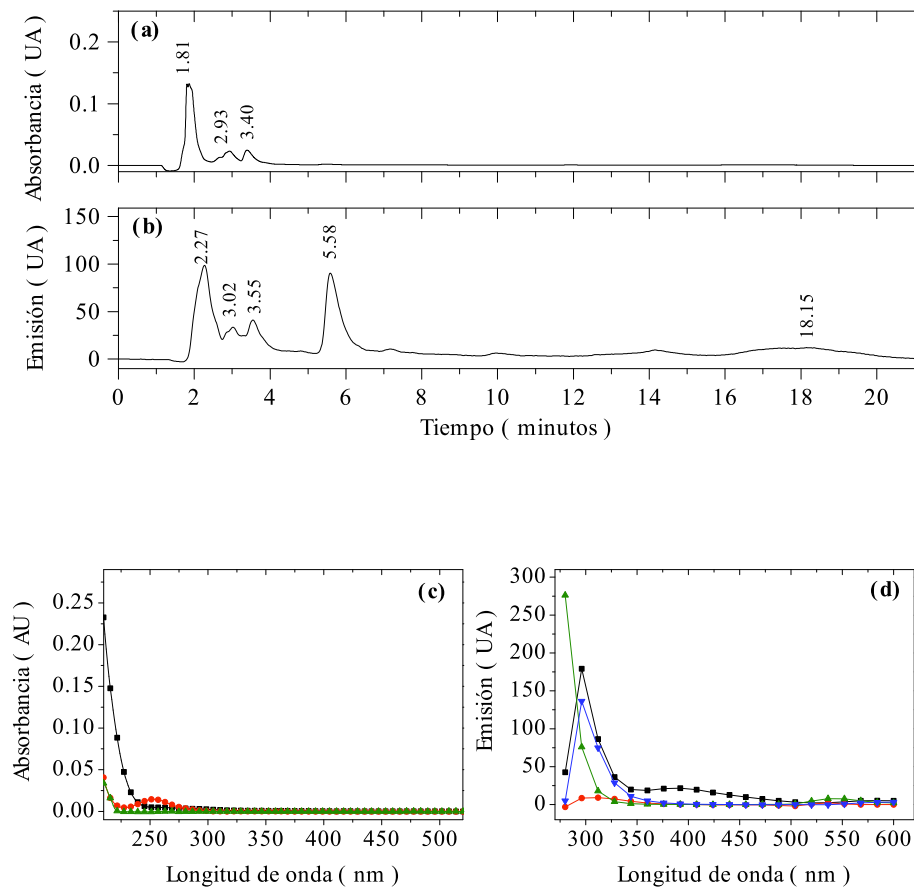
Inyección 10: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 218 nm y **(b)** emisión a 296 nm; espectros de **(c)** absorción a 2.18 (■), 3.40 (●), 7.57 (▲), 8.40 (▼) y 17.32 min (◆), **(d)** emisión a 2.38 (■), 2.90 (●), 8.53 (▲) y 17.52 min (▼).



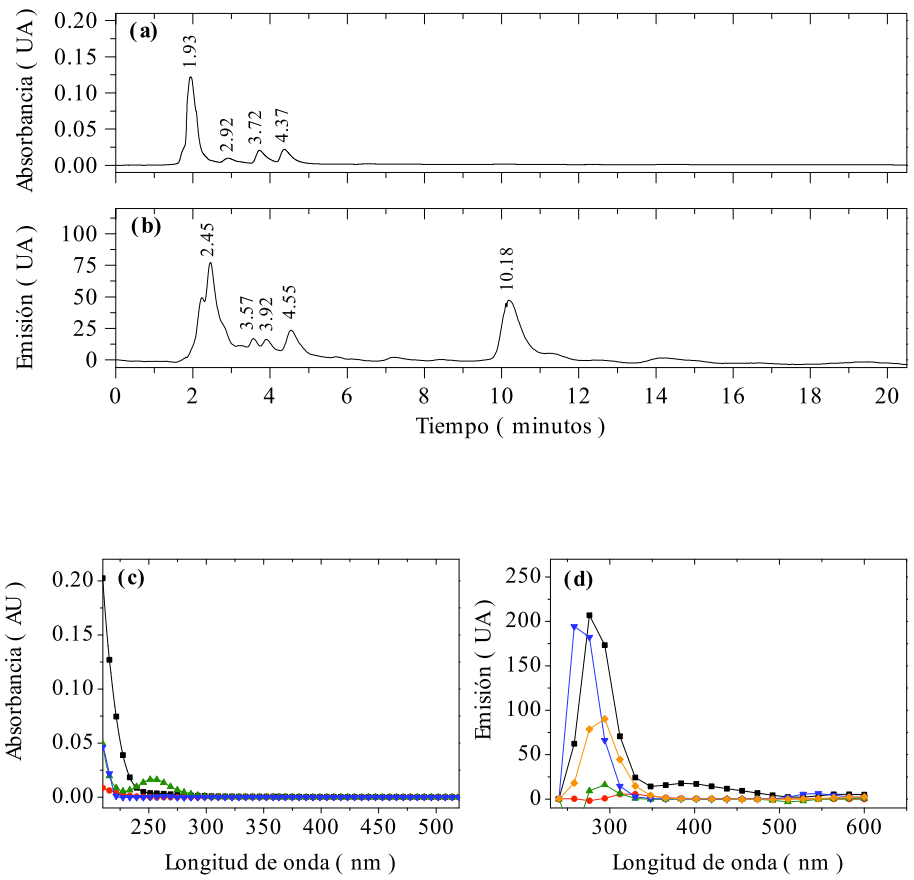
Inyección 11: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 212 nm y **(b)** emisión a 344 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.95 (■), 2.99 (●), 4.29 (▲) y 4.99 min (▼), **(d)** emisión a 2.17 (■), 4.02 (●), 7.12 (▲) y 10.25 min (▼).



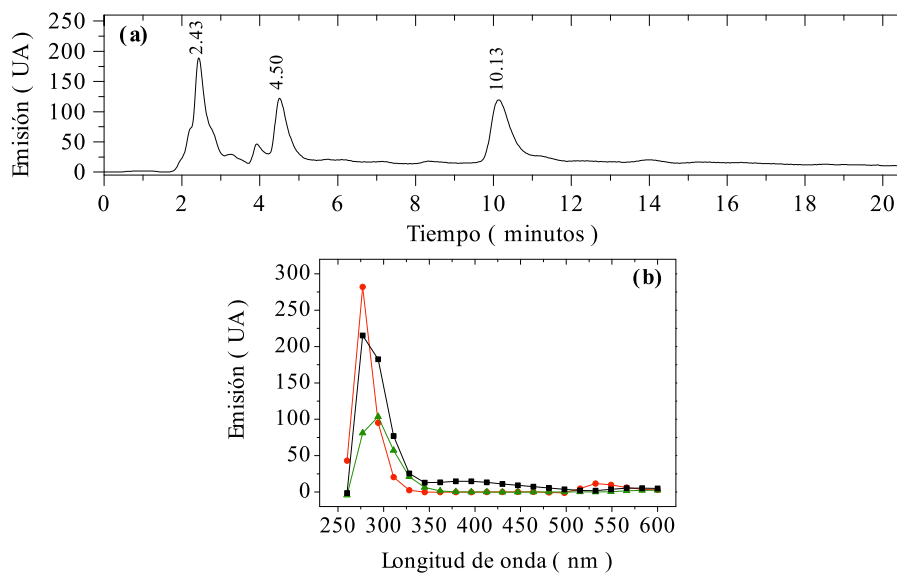
Inyección 12: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 312 nm; espectros de **(c)** absorción a 1.81 (■), 2.93 (●) y 3.40 min (▲), **(d)** emisión a 2.27 (■), 3.02 (●), 3.55 (▲), 5.58 (▼) y 18.15 min (◆).



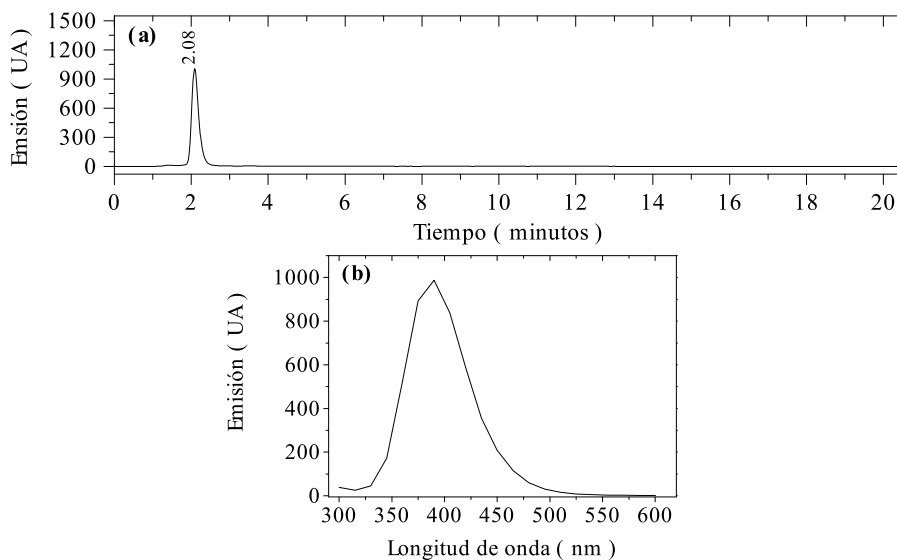
Inyección 13: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 216 nm y **(b)** emisión a 312 nm, espectros de **(c)** absorción a 1.93 (■), 2.92 (●), 3.72 (▲) y 4.37 min (▼); **(d)** emisión a 2.45 (■), 3.57 (●), 3.92 (▲), 4.55 (▼) y 10.18 min (◆).



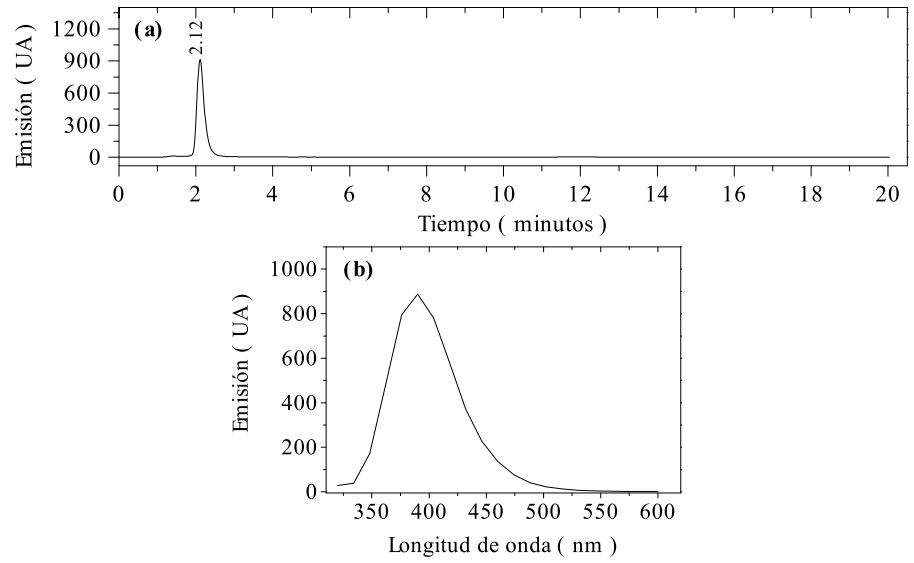
Inyección 14: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 294 nm; **(b)** espectros de emisión a 2.43 (■), 4.50 (●) y 10.13 min (▲).



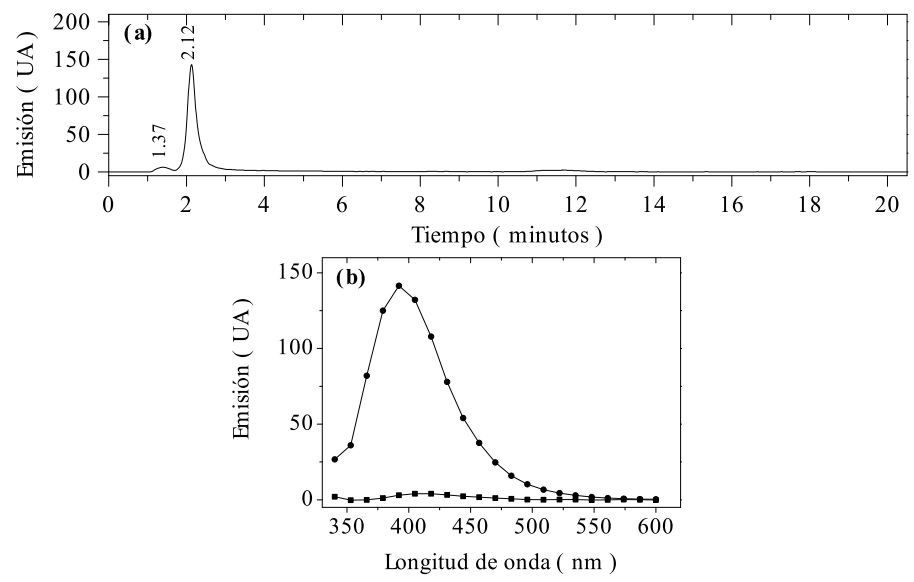
Inyección 15: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 390 nm; **(b)** espectro de emisión a 2.08 min.



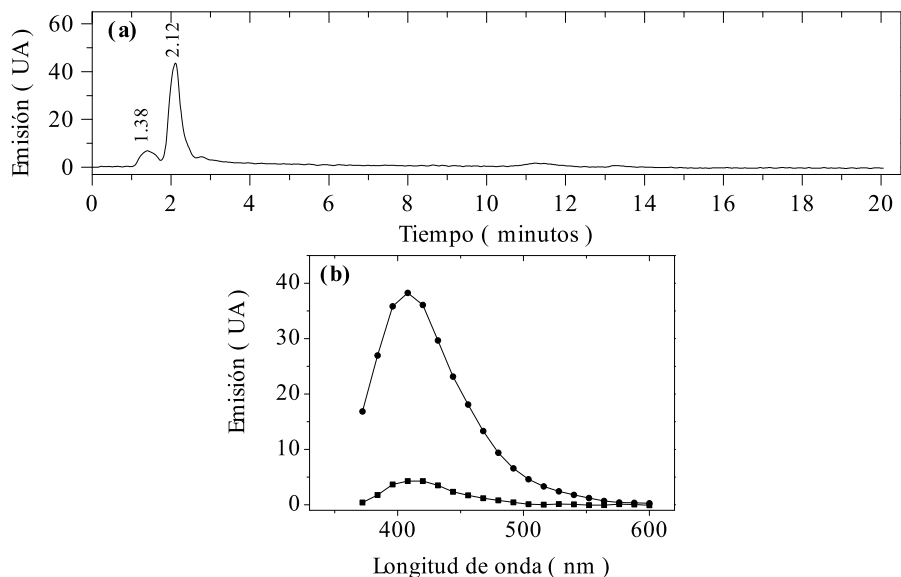
Inyección 16: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 390 nm; **(b)** espectro de emisión a 2.12 min.



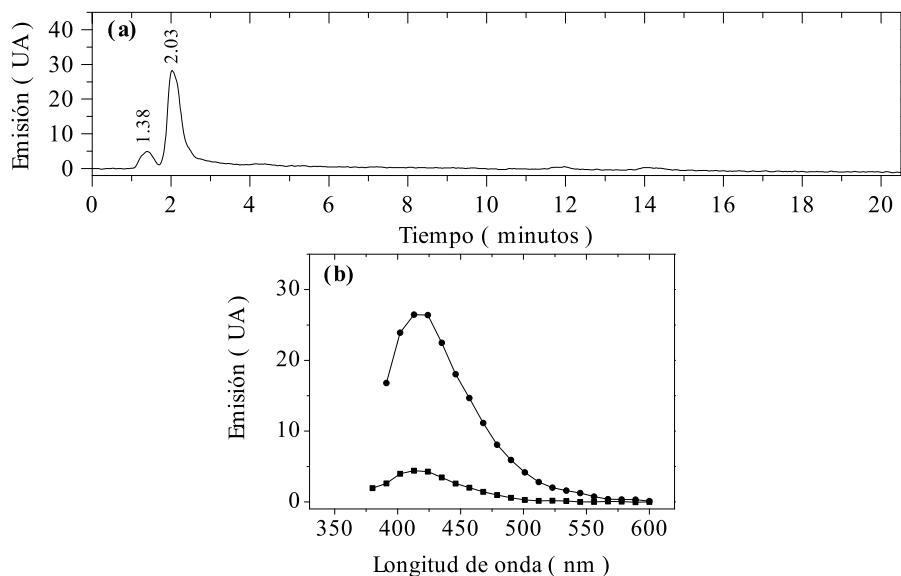
Inyección 17: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 405 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.37 (■) y 2.12 min (●).



Inyección 18: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 408 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.38 (■) y 2.12 min (●).



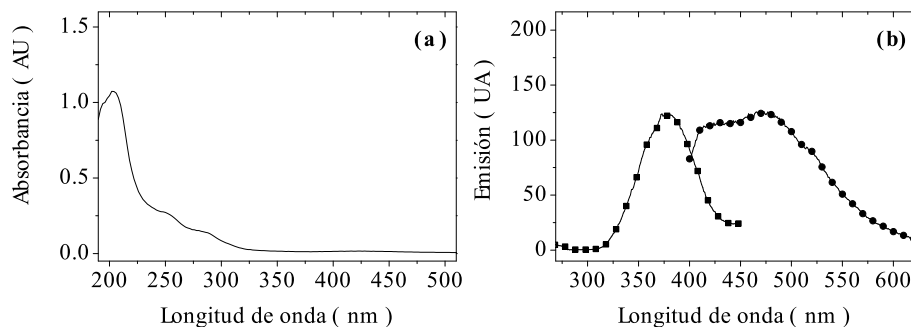
Inyección 19: Muestra, columna analítica C18. **(a)** Cromatograma de emisión a 424 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.38 (■) y 2.03 min (●).



CuCl₂H₂

Se trata de una muestra sintetizada por Noelia Vilar mediante un método electroquímico, en que se usó TBANO₃ como electrolito soporte.

Muestra inicial: **(a)** Espectro de absorción; **(b)** espectro de emisión excitando a 380 nm (■) y espectro de excitación a 480 nm de emisión (●).



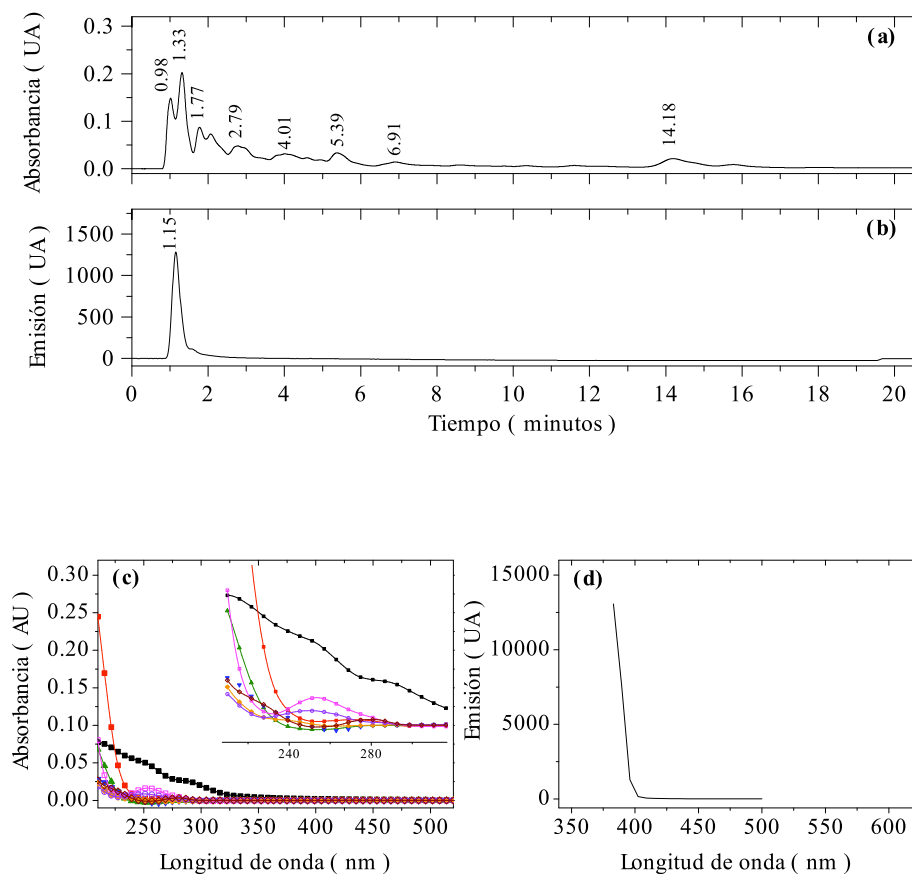
Inyecciones: Resumen de las inyecciones y condiciones de elución de la muestra CuCl₂H₂, fase reversa, columna C18, acoplada a una precolumna del mismo relleno, detector absorbancia y fluorescencia.

	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
1	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	345	barrido 355-600
2	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	376	barrido 386-600
3	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	230	barrido 240-600
4	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	250	barrido 260-600
5	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600

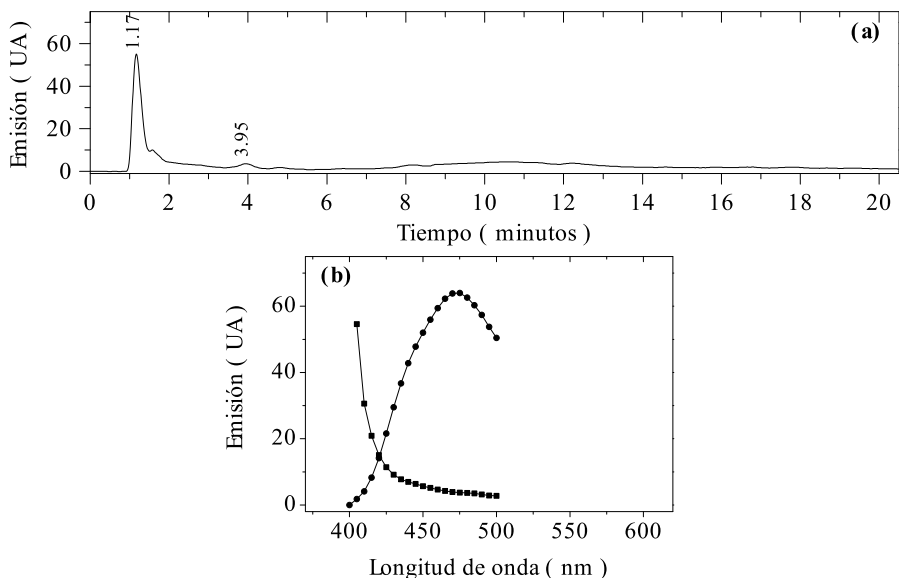
	vol/ μ l	flujo /ml \cdot min ⁻¹	fase móvil	excitación /nm	emisión /nm
6	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	290	barrido 300-600
7	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	310	barrido 320-600
8	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	330	barrido 340-600
9	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	350	barrido 360-600
10	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	370	barrido 360-600
11	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	390	barrido 400-600
12	10	1	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	410	barrido 420-600
13	200	20	65:35 CH ₃ CN:H ₂ O	270	barrido 280-600

Parte experimental

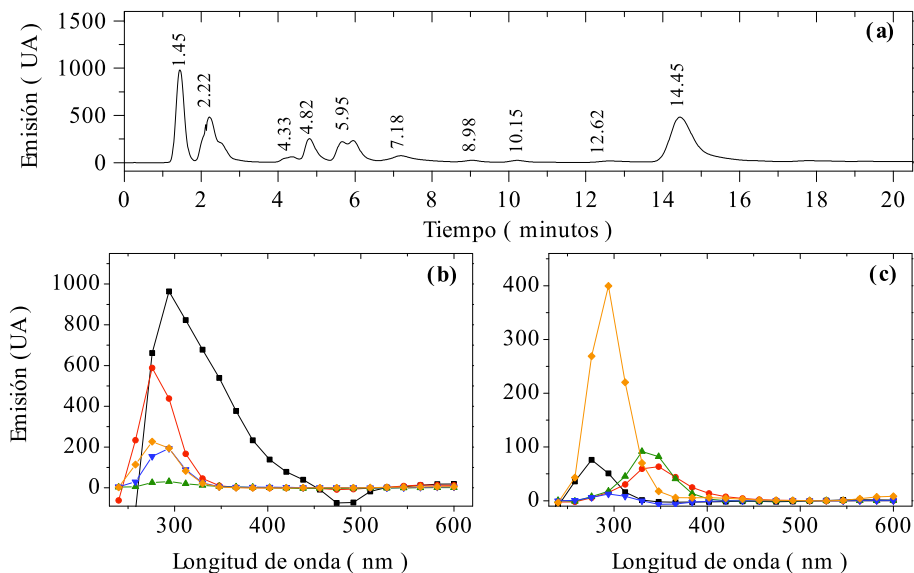
Inyección 1: Muestra, columna analítica. Cromatogramas de **(a)** absorción a 220 nm y **(b)** emisión a 396 nm; espectros de **(c)** absorción a 0.98 (■), 1.33 (●), 1.77 (▲), 2.79 (▼), 4.01 (◆), 5.39 (◻), 6.91 (○) y 14.18 min (◇), **(d)** emisión a 1.15 min.



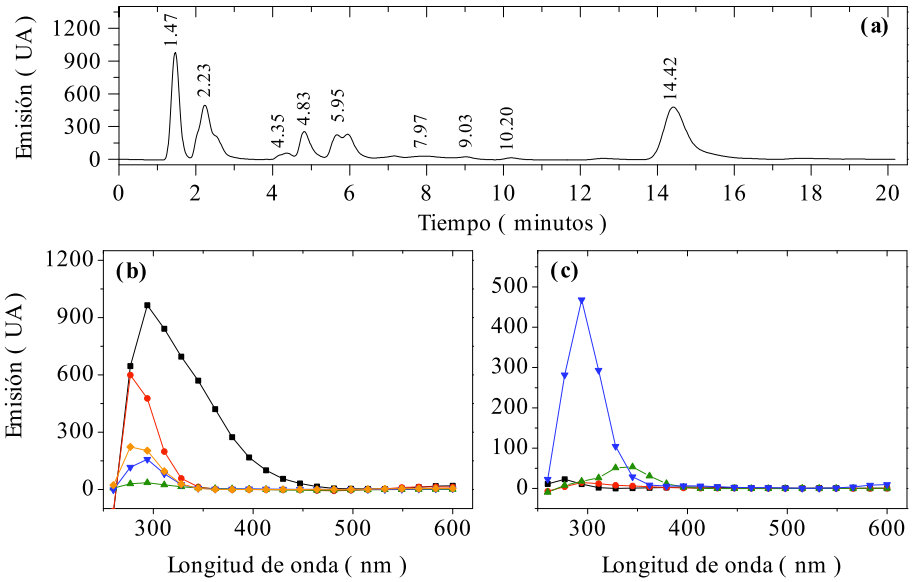
Inyección 2: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 405 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.17 (■) y 3.95 min (●).



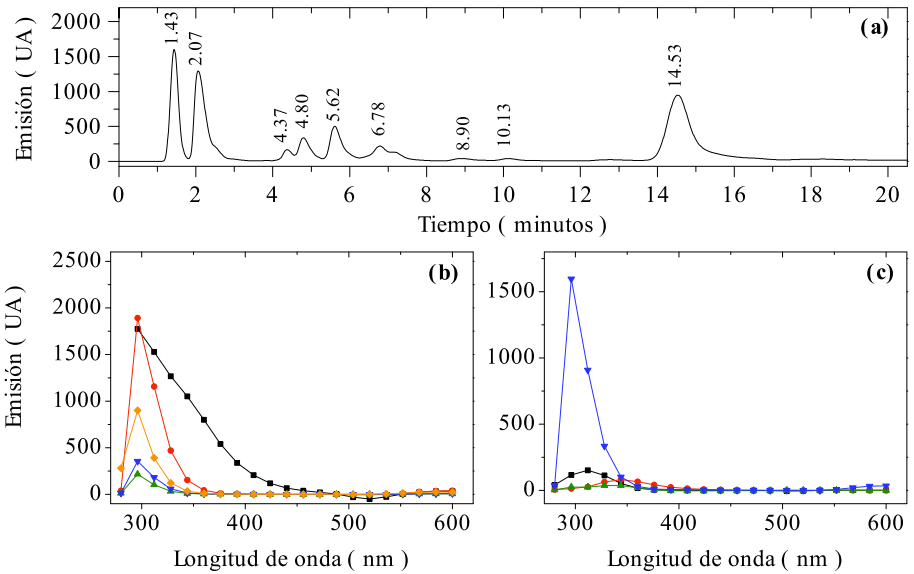
Inyección 3: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 294 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.45 (■), 2.22 (●), 4.33 (▲), 4.82 (▼), 5.95 (◆), **(c)** 7.18 (■), 8.98 (●), 10.15 (▲), 12.62 (▼) y 14.45 min (◆).



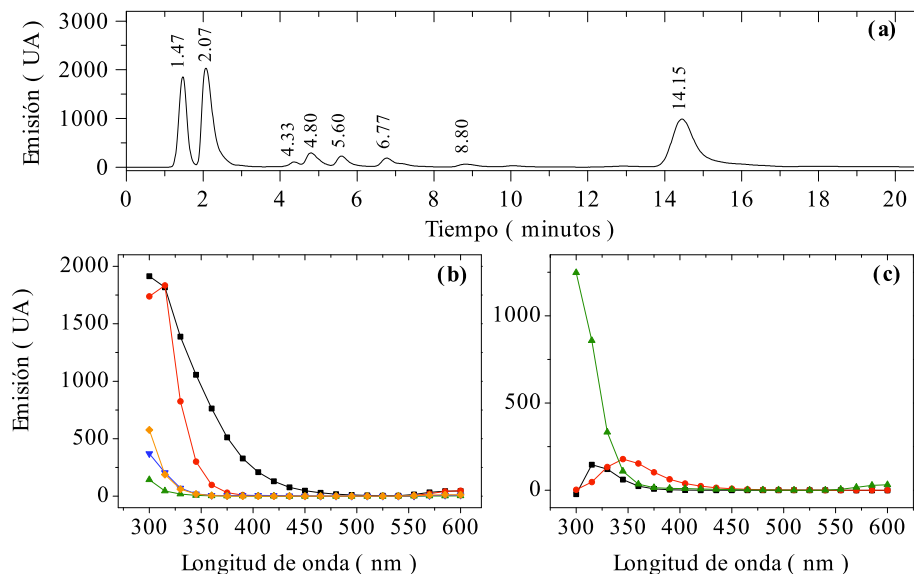
Inyección 4: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 294 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.47 (■), 2.23 (●), 4.35 (▲), 4.83 (▼), 5.95 (◆), **(c)** 7.97 (■), 9.03 (●), 10.20 (▲) y 14.42 min (▼).



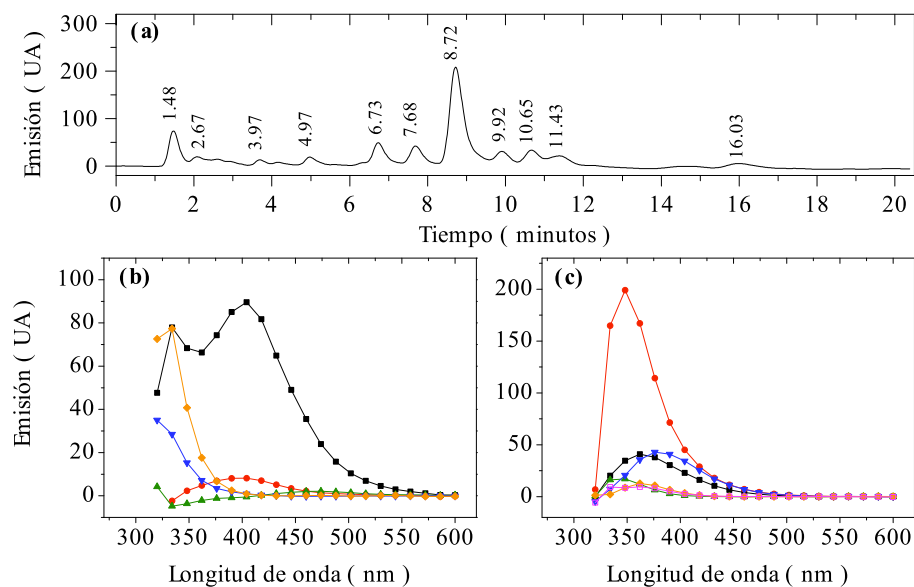
Inyección 5: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 312 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.43 (■), 2.07 (●), 4.37 (▲), 4.80 (▼), 5.62 (◆), **(c)** 6.78 (■), 8.90 (●), 10.13 (▲) y 14.53 min (▼).



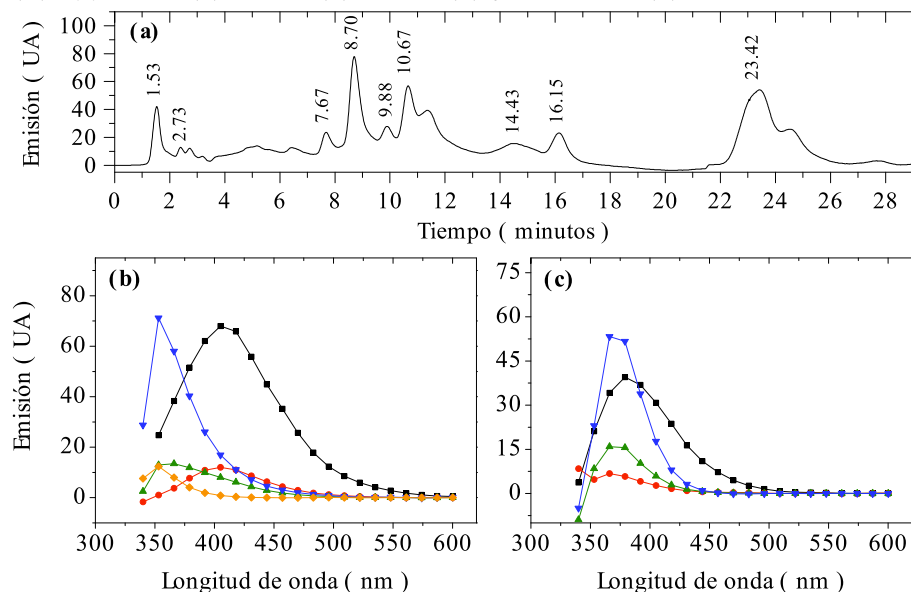
Inyección 6: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 315 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.47 (■), 2.07 (●), 4.33 (▲), 4.80 (▼), 5.60 (◆), **(c)** 6.77 (■), 8.80 (●) y 14.45 min (▲).



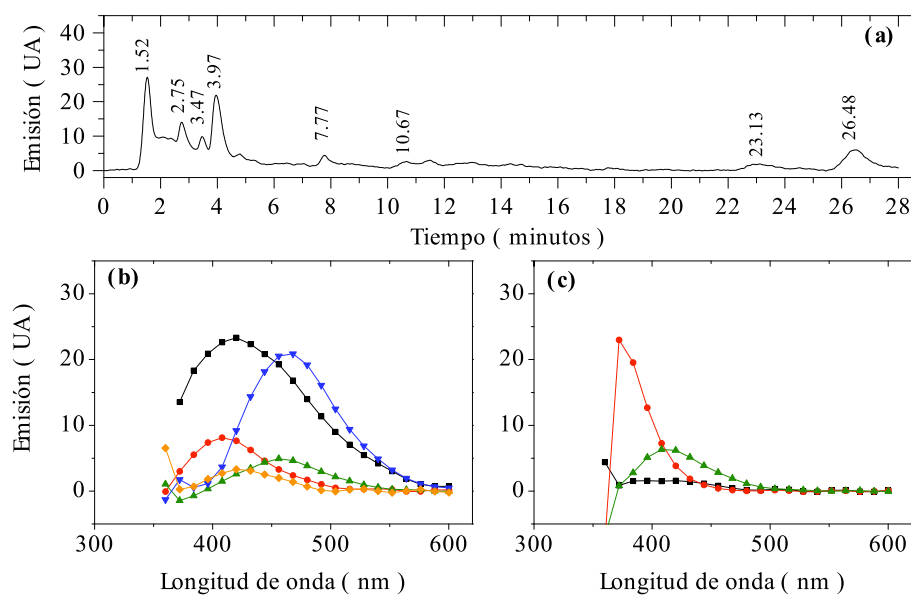
Inyección 7: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 348 nm; espectros de emisión a **(b)** 1.48 (■), 2.67 (●), 3.97 (▲), 4.97 (▼), 6.73 (◆), **(c)** 7.68 (■), 8.72 (●), 9.92 (▲), 10.65 (▼), 11.43 (◆) y 16.03 min (□).



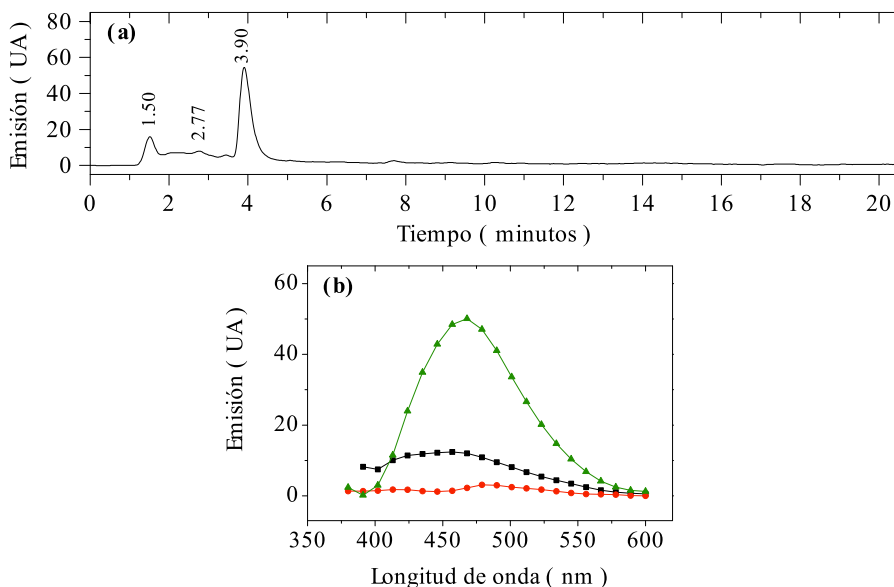
Inyección 8: Muestra, columna analítica. (a) Cromatograma de emisión a 366 nm; espectros de emisión a (b) 1.53 (■), 2.73 (●), 7.67 (▲), 8.70 (▼), 9.88 (◆), (c) 10.67 (■), 14.43 (●), 16.15 (▲) y 23.42 min (▼).



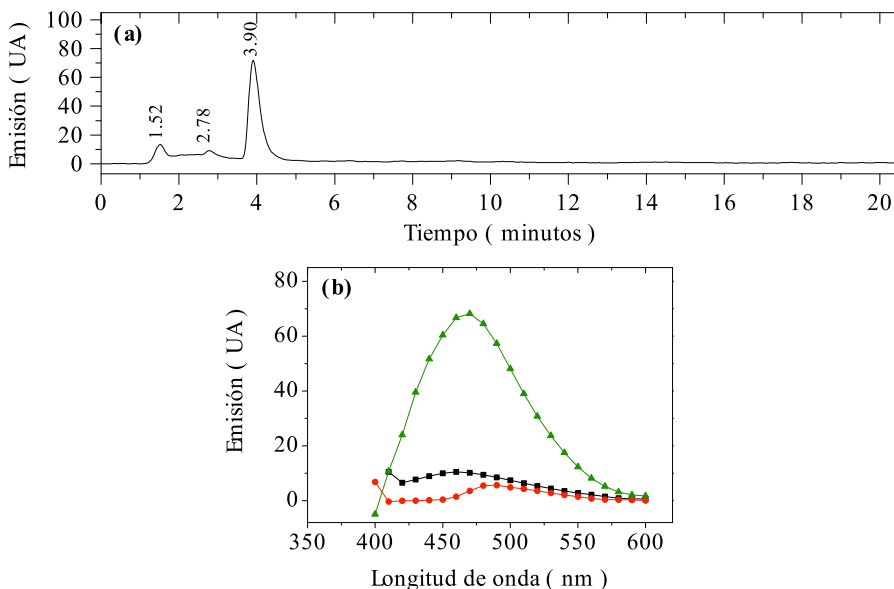
Inyección 9: Muestra, columna analítica. (a) Cromatograma de emisión a 432 nm; espectros de emisión a (b) 1.52 (■), 2.75 (●), 3.47 (▲), 3.97 (▼), 7.77 (◆), (c) 10.67 (■), 23.13 (●) y 26.48 min (▲).



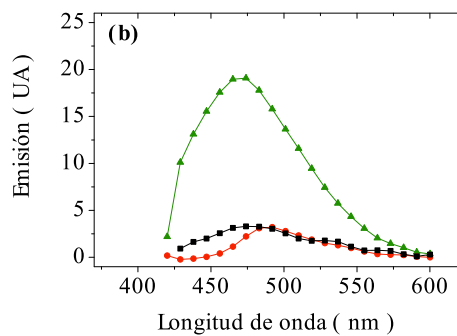
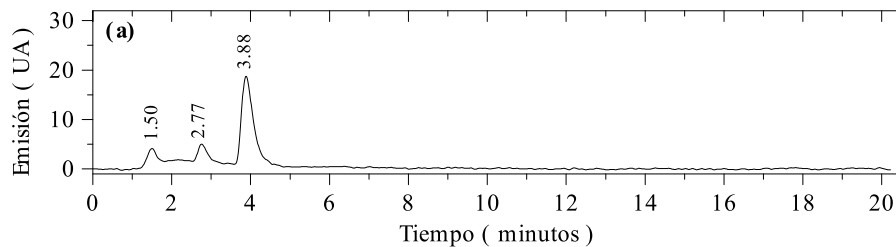
Inyección 10: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 468 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.50 (■), 2.77 (●) y 3.90 min (▲).



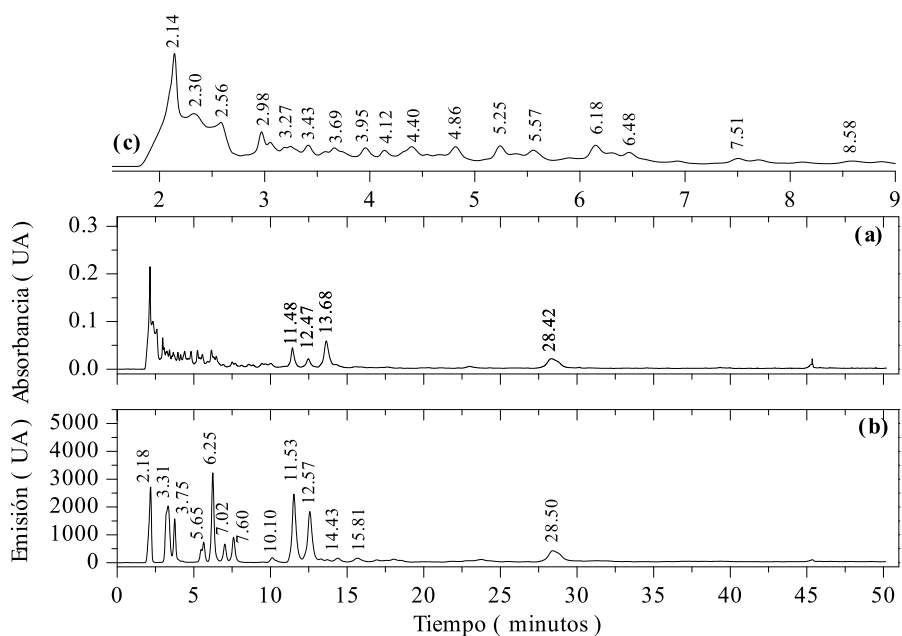
Inyección 11: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 470 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.52 (■), 2.78 (●) y 3.90 min (▲).



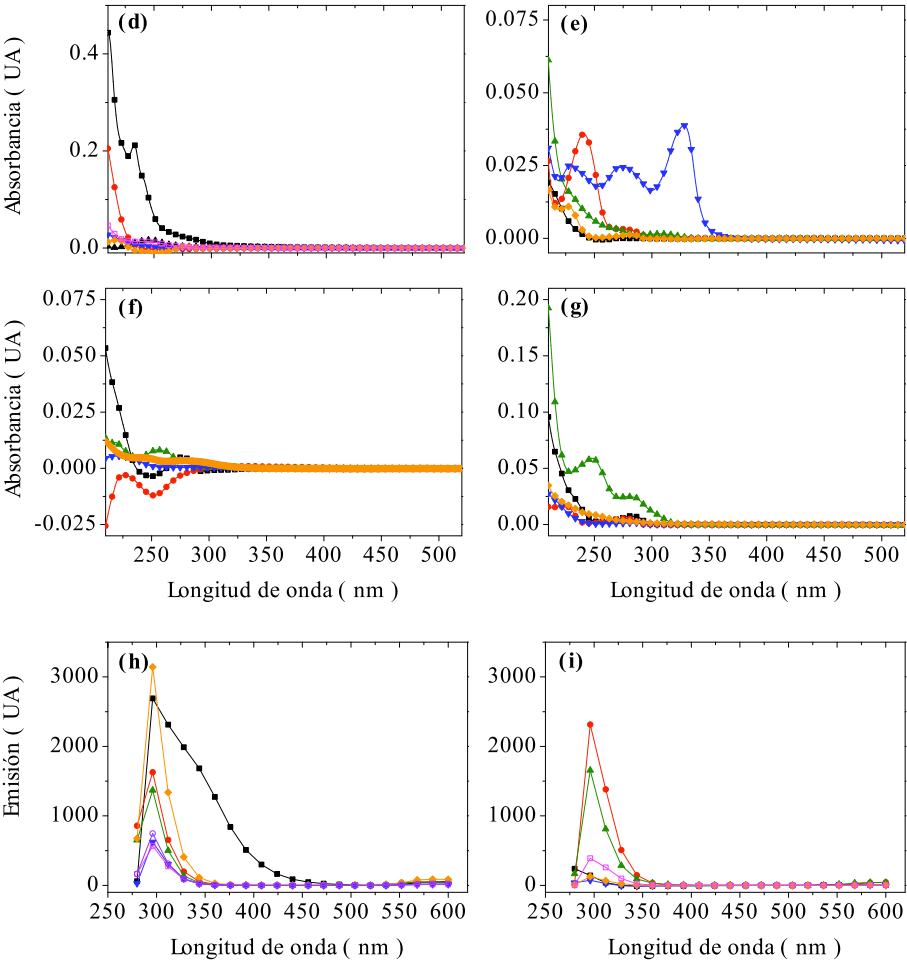
Inyección 12: Muestra, columna analítica. **(a)** Cromatograma de emisión a 483 nm; **(b)** espectros de emisión a 1.50 (■), 2.77 (●) y 3.88 min (▲) .



Inyección 13: Muestra, columna preparativa. Cromatogramas de **(a)** absorción a 224 nm y **(b)** emisión a 296 nm. **(c)** Ampliación del cromatograma de absorción (2 a 9 min). Espectros de absorción a **(d)** 2.14 (■), 2.30 (●), 2.56 (▲), 2.98 (▼), 3.27 (◆), 3.43 (□), **(e)** 3.69 (■), 3.95 (●), 4.12 (▲), 4.40 (▼), 4.86 (◆), **(f)** 5.25 (■), 5.57 (●), 6.18 (▲), 6.48 (▼), 7.51 (◆), **(g)** 8.58 (■), 11.48 (●), 12.47 (▲), 13.68 (▼) y 28.42 min(◆), y de emisión a **(h)** 2.18 (■), 3.31 (●), 3.75 (▲), 5.65 (▼), 6.25 (◆), 7.02 (□), 7.60 (○), **(i)** 10.10 (■), 11.53 (●), 12.57 (▲), 14.43 (▼), 15.81 (◆) y 28.50 min (□).

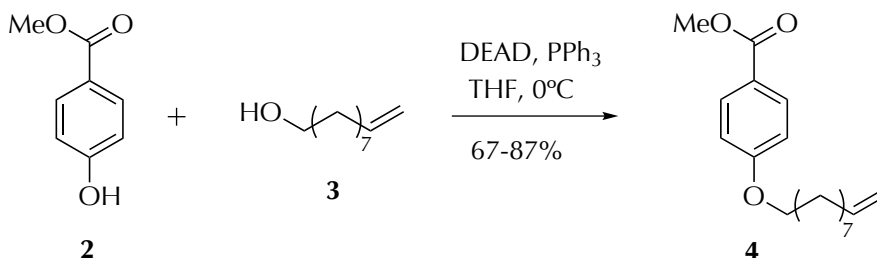


Parte experimental



5. Funcionalización de clústeres de cobalto.

4-(Dec-9-eniloxi)benzoato de metilo (**4**)



En un matraz de fondo redondo de 250 ml seco, bajo atmósfera de argón y con barra agitadora magnética se añadió **2** (5.79 g, 38.05 mmol) y PPh₃ (13.3 g, 5.05 mmol, 1.3 eq), y se disolvieron THF (65 ml). Sobre la disolución se añadió **3** (7.5 ml, 42.04 mmol, 1.1 eq) de **3**. A continuación se introdujo el matraz de fondo redondo en un baño de H₂O/hielo y se añadió DEAD (8 ml, 57.34 mmol, 1.5 eq) de DEAD gota a gota. La mezcla se dejó en agitación a t.a. durante 24h.

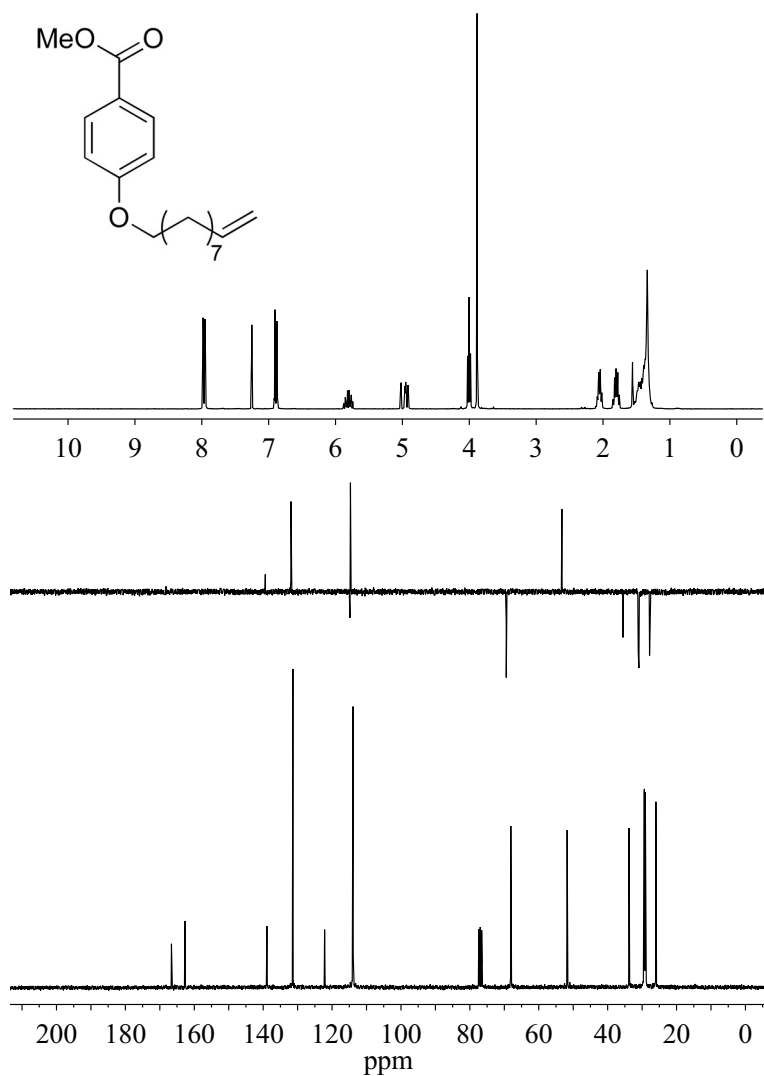
La reacción se detuvo mediante la adición de agua (10 ml) y la mezcla se concentró en el rotavapor. La pasta blanca anaranjada obtenida se disolvió en Et₂O (300 ml), y se lavó sucesivamente con una disolución de HCl 5% (4x50 ml), una disolución saturada de NaCl (2x50 ml) y finalmente con H₂O (1x50 ml). Las fases acuosas se extrajeron con Et₂O (1x100 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo pálido. El aceite se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice a presión (12 cm, eluyente: 500 ml hexano, 500 ml 5% AcOEt/hexano y 500 ml 10% AcOEt/hexano).

Se obtuvo **4** como un polvo blanco [9.627 g, 87%, R_f=0.75 (20% AcOEt/hexano)]

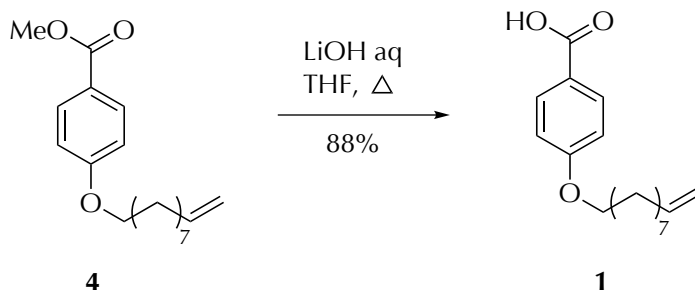
¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 1.33 (m, 10H, 5CH₂), 1.79 (m, 2H, CH₂), 2.05 (m, 2H, CH₂), 3.87 (s, CH₃), 3.99 (t, J=6.4 Hz, 2H, CH₂O), 4.93 (m, 1H, =CH₂*trans*), 5.02 (s, 1H, =CH₂*cis*), 5.80 (m, 1H, =CH), 6.88 (d, J=8.6, 2H, CHAr), 7.96 (d, J=8.6, 2H, CHAr). **¹³C-RMN (CDCl₃, 62.90 MHz, δ):** 26.00 (CH₂), 28.92 (CH₂), 29.07 (CH₂), 29.13 (CH₂), 29.33 (CH₂), 29.41

Parte experimental

(CH₂), 33.80 (CH₂), 51.76 (CH₃), 68.11 (CH₂O), 113.91 (CHAr), 114.04 (CH₂=), 122.16 (CAr), 131.37 (CHAr), 138.92 (CH=), 162.71 (CAr), 166.63 (CO). **EM (m/z, %):** 291.20 ([M+H]⁺, 100). **IR (pastilla KBr):** 1720 cm⁻¹(C=O). **AE (%):** Calculado para [C₁₈H₂₆O₃]: C, 74.44; H, 9.02. Encontrado: C, 74.95; H, 9.24.



Ácido 4-(dec-9-eniloxi)benzoico (**1**)



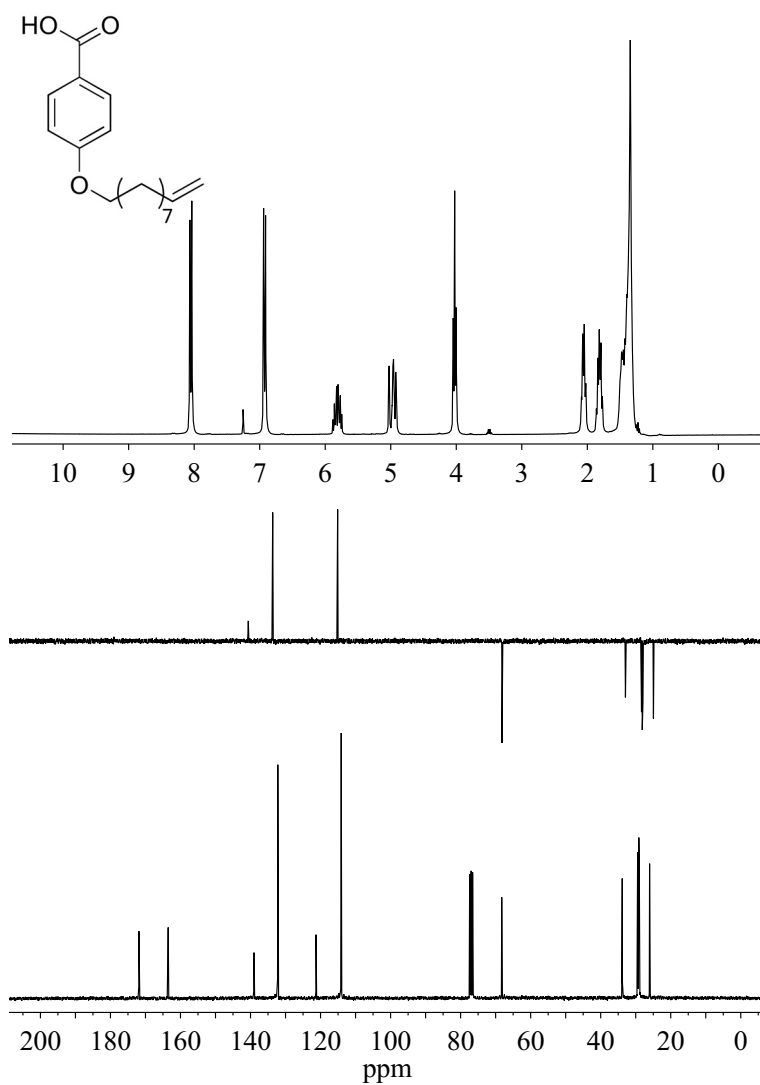
En un matraz de fondo redondo de 50 ml seco, bajo atmósfera inerte y provisto de barra magnética agitadora y refrigerante se disolvió **4** (0.589 g, 2.02 mmol) en THF (15 ml). Sobre la disolución en agitación se añadió lentamente una disolución 2M en agua de LiOH (8 ml, 16.22 mmol, 8 eq). La mezcla se agitó a reflujo durante 24h.

La mezcla se dejó enfriar a t.a. y se concentró en el rotavapor, obteniéndose una pasta blanca, que se disolvió en Et₂O (50 ml) y se le añadió poco a poco y con agitación una disolución acuosa de HCl (5%) hasta alcanzar pH≈1. Se observó la aparición de dos fases y un precipitado que se disolvió en AcOEt (15 ml). La fase acuosa se extrajo con AcOEt (2x15 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron en el rotavapor, obteniéndose un precipitado blanco que se purificó por cristalización de Et₂O.

Se obtuvo el ácido **1** como un polvo blanco fino [0.495 g, 88%, R_f=0.125 (10% de AcOEt/hexano)].

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 1.35 (s, 10H, 5CH₂), 1.82 (m, 2H, CH₂), 2.05 (m, 2H, CH₂), 4.03 (t, J=6.4 Hz, 2H, CH₂O), 4.95 (m, 1H, =CH₂*cis*), 5.03 (m, 1H, =CH₂*trans*), 5.82 (m, 1H, CH), 6.93 (d, J=8.8 Hz, 2H, CHAr), 8.05 (d, J=8.8 Hz, 2H, CHAr). **¹³C-RMN (CDCl₃, 75.46 MHz, δ):** 26.04 (CH₂), 28.97 (CH₂), 29.12 (CH₂), 29.16 (CH₂), 29.37 (CH₂), 29.46 (CH₂), 33.85 (CH₂), 68.27 (CH₂O), 114.10 (CHAr), 114.10 (CH₂=), 121.30 (CAr), 132.22 (CHAr), 139.11 (CH=), 163.51 (CAr), 171.87 (CO). **EM (m/z, %):** 277 (M⁺, 48.27). **IR (pastilla KBr):** 1683 cm⁻¹(C=O). **AE (%):** Calculado para [C₁₇H₂₄O₃]: C, 73.90; H, 8.70. Encontrado: C, 73.55; H, 8.65.

Parte experimental



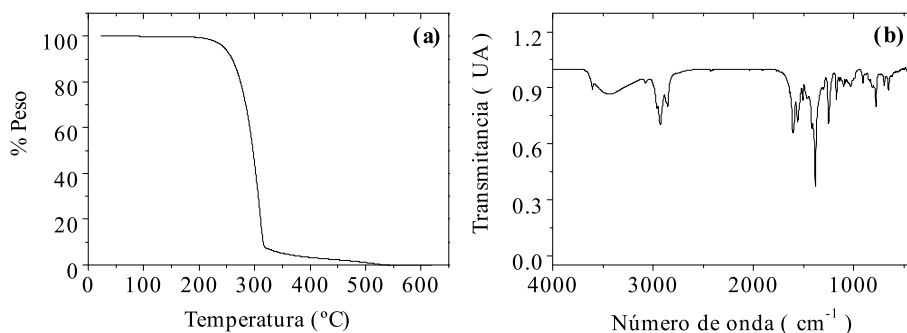
Nanopartículas de cobalto

En una celda electrolítica se situaron enfrentados un electrodo de trabajo de platino y un contraelectrodo de cobalto, ambos con una superficie de 2.5 cm^2 , sumergidos en 100 ml de una disolución electrolítica de TBANO_3 0,1 M en acetonitrilo, previamente desgasificada por burbujeo de nitrógeno. Todos los potenciales se midieron usando como referencia un electrodo de Ag/AgCl . Con todo el montaje preparado se llevó a cabo una electrolisis galvanostática, aplicando una densidad de corriente de $5 \text{ mA}/\text{cm}^2$ durante 5400 s. Durante todo el proceso se mantuvo atmósfera inerte de nitrógeno, fuerte agitación y temperatura termostatzada a $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$

Tras el proceso electroquímico se obtuvieron los clústeres de cobalto como un sólido marrón en el fondo de la celda. Este sólido se trasvasó a un erlenmeyer con una bomba peristáltica y se introdujo en una caja seca, manteniendo la atmósfera de nitrógeno durante todo el proceso. Una vez en la caja seca, se secó el sólido por decantación y se lavó con AcOEt (4x20 ml). A continuación se añadió el compuesto **1** (0.029 g, 0.105 mmol, 100 moléculas por partícula de Co) disuelto en AcOEt (50 ml) y se agitó fuertemente, observándose que cierta cantidad de sólido quedó en suspensión, ya que las partículas no se dispersan totalmente en este disolvente.

Los clústeres así funcionalizados se caracterizaron mediante IR y TGA (rampa de temperatura $40\text{--}700 \text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $20^\circ \text{C}/\text{min}$), tras precipitarlas mediante centrifugación y eliminar el disolvente por decantación.

IR (b) (pastilla de KBr): 1384 cm^{-1} (C-O). **TGA (a) (%Peso, mg muestra):** 8.3, 0.453; 22.45, 1.182; 34.24, 1.804; 9.04, 0.476; 26.00, 1.368.



BIBLIOGRAFÍA

1. Jones, R. A. L. *Soft machines, nanotechnology and life*. Oxford University Press: Oxford, 2004.
2. Roco, M. International perspective on government nanotechnology funding in 2005. *J. Nanopart. Res.* **2005**, 7 (6), 707-712.
3. Drexler, K. E., Engines of creation. En *Engines of creation 2.0. The coming era of nanotechnology. Twentieth anniversary edition* [Online] WOWIO: 2006. e-drexler.com.
4. Feynman, R. There is plenty of room at the bottom. *Eng. Sci.* **1960**, 23 (5), 22-36.
5. Faraday, M. The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1847**, 147, 145-181.
6. Binning, G.; Rohrer, H. Scanning tunneling microscopy. *IBM J. Res. Dev.* **1986**, 30 (4), 355-369.
7. Eigler, D. M.; Schweizer, E. K. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature* **1990**, 344 (6266), 524-526.
8. Sugimoto, T. *Monodispersed particles*. 1 ed.; Elsevier: Amsterdam, 2001.
9. Tao, A. R.; Habas, S.; Yang, P. Shape control of colloidal metal nanocrystals. *Small* **2008**, 4 (3), 310-325.
10. Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (1), 60-103.
11. Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* **2006**, 312 (5776), 1027-1030.
12. Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, 56 (11), 1649-1659.
13. Whetten, R. L.; Khoury, J. T.; Alvarez, M. M.; Murthy, S.; Vezmar, I.; Wang, Z. L.; Stephens, P. W.; Cleveland, C. L.; Luedtke, W. D.; Landman, U. Nanocrystal gold molecules. *Adv. Mater.* **1996**, 8 (5), 428-433.
14. Sanchez, A.; Abbet, S.; Heiz, U.; Schneider, W. D.; Häkkinen, H.; Barnett, R. N.; Landman, U. When gold is not noble: Nanoscale gold catalysts. *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103 (48), 9573-9578.
15. Harding, C.; Habibpour, V.; Kunz, S.; Farnbacher, A. N.-S.; Heiz, U.; Yoon, B.; Landman, U. Control and manipulation of gold

- nanocatalysis: effects of metal oxide support thickness and composition. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (2), 538-548.
16. Haruta, M. Catalysis: Gold rush. *Nature* **2005**, *437* (7062), 1098-1099.
17. Cotton, F. A. Metal atom clusters in oxide systems. *Inorg. Chem.* **1964**, *3* (9), 1217-1220.
18. Zheng, J.; Zhang, C. W.; Dickson, R. M. Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93* (7), 077402.
19. Vilar-Vidal, N.; Blanco, M. C.; Lopez-Quintela, M. A.; Rivas, J.; Serra, C. Electrochemical synthesis of very stable photoluminescent copper clusters. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (38), 15924-15930.
20. Rodriguez-Vazquez, M. J.; Blanco, M. C.; Lourido, R.; Vazquez-Vazquez, C.; Pastor, E.; Planes, G. A.; Rivas, J.; Lopez-Quintela, M. A. Synthesis of atomic gold clusters with strong electrocatalytic activities. *Langmuir* **2008**, *24* (21), 12690-12694.
21. Zheng, J.; Petty, J. T.; Dickson, R. M. High quantum yield blue emission from water-soluble Au₈ nanodots. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (26), 7780-7781.
22. Fernandez-Argüelles, M. T.; Yakovlev, A.; Sperling, R. A.; Luccardini, C.; Gaillard, S.; Medel, A. S.; Mallet, J.; Brochon, J.; Feltz, A.; Oheim, M.; Parak, W. J. Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobes. *Nano Lett.* **2007**, *7* (9), 2613-2617.
23. Santiago Gonzalez, B.; Rodriguez, M. J.; Blanco, C.; Rivas, J.; Lopez-Quintela, M. A.; Martinho, J. M. G. One step synthesis of the smallest photoluminescent and paramagnetic PVP-protected gold atomic clusters. *Nano Lett.* **2010**, *10* (10), 4217-4221.
24. Wilcoxon, J.; Martin, J.; Parsapour, F.; Wiedenman, B.; Kelley, D. Photoluminescence from nanosize gold clusters. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108* (21), 9137-9143.
25. Félix, C.; Sieber, C.; Harbich, W.; Buttet, J.; Rabin, I.; Schulze, W.; Ertl, G. Ag₈ fluorescence in argon. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86* (14), 2992-2995.
26. Schaeffer, N.; Tan, B.; Dickinson, C.; Rosseinsky, M. J.; Laromaine, A.; McComb, D. W.; Stevens, M. M.; Wang, Y.; Petit, L.; Barentin, C.; Spiller, D. G.; Cooper, A. I.; Levy, R. Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters

- in the 1.1-1.7 nm size range. *Chem. Commun.* **2008**, (34), 3986-3988.
27. de Heer, W. A. The physics of simple metal clusters: Experimental aspects and simple models. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, 65 (3), 611-676.
 28. Lee, H. M.; Ge, M.; Sahu, B. R.; Tarakeshwar, P.; Kim, K. S. Geometrical and electronic structures of gold, silver, and gold-silver binary clusters: Origins of ductility of gold and gold-silver alloy formation. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107 (37), 9994-10005.
 29. Clemenger, K. Ellipsoidal shell structure in free-electron metal clusters. *Phys. Rev. B* **1985**, 32 (2), 1359-1362.
 30. Werner, J. Review: Chemical aspects of the use of gold clusters in structural biology. *J. Struct. Biol.* **1999**, 127 (2), 106-112.
 31. Malatesta, L.; Naldini, L.; Simonetta, G.; Cariati, F. Triphenylphosphine-gold(0)/gold(I) compounds. *Chem. Commun.* **1965**, 212.
 32. Habeeb Muhammed, M.; Ramesh, S.; Sinha, S.; Pal, S.; Pradeep, T. Two distinct fluorescent quantum clusters of gold starting from metallic nanoparticles by pH-dependent ligand etching. *Nano Res.* **2008**, 1 (4), 333-340.
 33. Duan, H.; Nie, S. Etching colloidal gold nanocrystals with hyperbranched and multivalent polymers: A new route to fluorescent and water-soluble atomic clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (9), 2412-2413.
 34. Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. Glutathione-protected gold clusters revisited: Bridging the gap between gold(I)-thiolate complexes and thiolate-protected gold nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (14), 5261-5270.
 35. López-Quintela, M. A. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, 8 (2), 137-144.
 36. Ledo-Suárez, A.; Rivas, J.; Rodríguez-Abreu, C. F.; Rodríguez, M. J.; Pastor, E.; Hernández-Creus, A.; Oseroff, S. B.; López-Quintela, M. A. Facile synthesis of stable subnanosized silver clusters in microemulsions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (46), 8823-8827.
 37. Vázquez-Vázquez, C.; Bañobre-López, M.; Mitra, A.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J. Synthesis of small atomic copper clusters in microemulsions. *Langmuir* **2009**, 25 (14), 8208-8216.

38. Rodríguez-Sánchez, L.; Blanco, M. C.; López-Quintela, M. A. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (41), 9683-9688.
39. Rodríguez-Sánchez, M. L.; Rodríguez, M. J.; Blanco, M. C.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. Kinetics and mechanism of the formation of Ag nanoparticles by electrochemical techniques: A plasmon and cluster time-resolved spectroscopic study. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (3), 1183-1191.
40. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques*. Academic Press: Londres, 2008.
41. Singer, J. M.; Plotz, C. M. The latex fixation test: I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* **1956**, *21* (6), 888-892.
42. Page Faulk, W.; Malcolm Taylor, G. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **1971**, *8* (11), 1081-1083.
43. Tsunoyama, R.; Tsunoyama, H.; Pannopard, P.; Limtrakul, J.; Tsukuda, T. MALDI mass analysis of 11 kDa gold clusters protected by octadecanethiolate ligands. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (38), 16004-16009.
44. Petty, J. T.; Zheng, J.; Hud, N. V.; Dickson, R. M. DNA-Templated Ag nanocluster formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (16), 5207-5212.
45. Jin, R.; Egusa, S.; Scherer, N. F. Thermally-induced formation of atomic Au clusters and conversion into nanocubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (32), 9900-9901.
46. López-Quintela, M. A.; Rivas, J. Procedure for the synthesis of atomic quantum clusters. PCT/ES2006/07121, 2005.
47. Reetz, M. T.; Helbig, W. Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (16), 7401-7402.
48. Reetz, M. T.; Maase, M. Redox-controlled size-selective fabrication of nanostructured transition metal colloids. *Adv. Mater.* **1999**, *11* (9), 773-777.
49. Reetz, M. T.; Winter, M.; Breinbauer, R.; Thurn-Albrecht, T.; Vogel, W. Size-selective electrochemical preparation of surfactant-stabilized Pd-, Ni- and Pt/Pd colloids. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* (5), 1084-1094.
50. Rodríguez-Sánchez, L. Síntesis electroquímica de nanopartículas de Ag y Co. Cinética de formación y propiedades fisicoquímicas. Tesis

- doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2003.
51. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. John Wiley & Sons: New York, 2001.
 52. Bockris, T. O. M.; Reddy, A. K. N.; Gamba-Aldeco, M. *Modern electrochemistry. Fundamentals of electronics*. Kluwer Academic: New York, 2000; Vol. 2A.
 53. Roth, J. D.; Weaver, M. J. Role of double-layer cation on the potential-dependent stretching frequencies and binding geometries of carbon monoxide at platinum-nonaqueous interfaces. *Langmuir* **1992**, 8 (5), 1451-1458.
 54. Donkers, R. L.; Song, Y.; Murray, R. W. Substituent effects on the exchange dynamics of ligands on 1.6 nm diameter gold nanoparticles. *Langmuir* **2004**, 20 (11), 4703-4707.
 55. Jimenez, V. L.; Georganopoulou, D. G.; White, R. J.; Harper, A. S.; Mills, A. J.; Lee, D. I.; Murray, R. W. Hexanethiolate monolayer protected 38 gold atom cluster. *Langmuir* **2004**, 20 (16), 6864-6870.
 56. Link, S.; El-Sayed, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103 (21), 4212-4217.
 57. Buceta, D. Caracterización y propiedades catalíticas de clústeres cuánticos subnanométricos. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2011.
 58. Guillén-Villafuerte, O.; García, G.; Anula, B.; Pastor, E.; Blanco, M. C.; López-Quintela, M. A.; Hernández-Creus, A.; Planes, G. A. Assembly of subnanometric 2D Pt nanoislands in parallel rows onto Au(111) by self-organization of Pt clusters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45 (26), 4266-4269.
 59. Weil, J. A.; Bolton, J. R. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical application*. Wiley-Interscience: New Jersey, 2007.
 60. Crespo, P.; Litran, R.; Rojas, T. C.; Multigner, M.; de la Fuente, J. M.; Sanchez-Lopez, J. C.; Garcia, M. A.; Hernando, A.; Penades, S.; Fernandez, A. Permanent magnetism, magnetic anisotropy, and hysteresis of thiol-capped gold nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 93 (8), 087204.
 61. Cullity, B. D.; Graham, C. D. *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2009.

62. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, (7), 801-802.
63. Schaaff, T. G.; Shafigullin, M. N.; Khoury, J. T.; Vezmar, I.; Whetten, R. L.; Cullen, W. G.; First, P. N.; Gutierrez-Wing, C.; Ascensio, J.; Jose-Yacaman, M. J. Isolation of smaller nanocrystal Au molecules: Robust quantum effects in optical spectra. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (40), 7885-7891.
64. Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C.-J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glush, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 17-30.
65. Schaaff, T. G.; Knight, G.; Shafigullin, M. N.; Borkman, R. F.; Whetten, R. L. Isolation and selected properties of a 10.4 kDa gold:glutathione cluster compound. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (52), 10643-10646.
66. Huang, T.; Murray, R. W. Visible luminescence of water-soluble monolayer-protected gold clusters. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (50), 12498-12502.
67. Negishi, Y.; Takasugi, Y.; Sato, S.; Yao, H.; Kimura, K.; Tsukuda, T. Magic-numbered Au-*n* clusters protected by glutathione monolayers (*n*=18, 21, 25, 28, 32, 39): Isolation and spectroscopic characterization. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (21), 6518-6519.
68. Shichibu, Y.; Negishi, Y.; Tsukuda, T.; Teranishi, T. Large-scale synthesis of thiolated Au-25 clusters via ligand exchange reactions of phosphine-stabilized Au-11 clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (39), 13464-13465.
69. Tarr, D. A.; Miessler, G. L. *Inorganic chemistry*. Pearson Prentice Hall: New Jersey, 2004.
70. Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (22), 3533-3539.
71. Jolly, W. L. *Modern inorganic chemistry*. McGraw-Hill: New York, 1991.
72. Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L. Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (46), 13940-13941.

73. Hortiguera, M. J.; Aranaz, I.; Gutierrez, M. C.; Ferrer, M. L.; del Monte, F. Chitosan gelation induced by the in situ formation of gold nanoparticles and its processing into macroporous scaffolds. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (1), 179-186.
74. Hiramatsu, H.; Osterloh, F. E. A simple large-scale synthesis of nearly monodisperse gold and silver nanoparticles with adjustable sizes and with exchangeable surfactants. *Chem. Mater.* **2004**, *16* (13), 2509-2511.
75. Chen, M.; Feng, Y.-G.; Wang, X.; Li, T.-C.; Zhang, J.-Y.; Qian, D.-J. Silver nanoparticles capped by oleylamine: formation, growth, and self-organization. *Langmuir* **2007**, *23* (10), 5296-5304.
76. Xie, S.; Qiao, M.; Zhou, W.; Luo, G.; He, H.; Fan, K.; Zhao, T.; Yuan, W. Controlled synthesis, characterization, and crystallization of Ni-P nanospheres. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (51), 24361-24368.
77. Pirkkalainen, K.; Leppänen, K.; Vainio, U.; Webb, M.; Elbra, T.; Kohout, T.; Nykänen, A.; Ruokolainen, J.; Kotelnikova, N.; Serimaa, R. Nanocomposites of magnetic cobalt nanoparticles and cellulose. *Eur. Phys. J. D* **2008**, *49* (3), 333-342.
78. Nakai, H.; Homma, T.; Komatsu, I.; Osaka, T. Ab initio molecular orbital study of the oxidation mechanism of hypophosphite ion as a reductant for an electroless deposition process. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (9), 1701-1704.
79. Ding, X.; Li, Z.; Yang, J.; Hou, J.; Zhu, Q. Adsorption energies of molecular oxygen on Au clusters. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120* (20), 9594.
80. Wei, G. T.; Liu, F. K. Separation of nanometer gold particles by size exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *836* (2), 253-260.
81. Liu, F. K.; Wei, G. T. Effect of mobile-phase additives on separation of gold nanoparticles by size-exclusion chromatography. *Chromatographia* **2004**, *59* (1-2), 115-119.
82. Wilcoxon, J. P.; Provencio, P. Etching and aging effects in nanosize Au clusters investigated using high-resolution size-exclusion chromatography. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (47), 12949-12957.
83. Wellsted, H.; Sitsen, E.; Caragheorgheopol, A.; Chechik, V. Polydisperse composition of mixed mono layer-protected, spin-labeled Au nanoparticles. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (7), 2010-2016.

84. Schaaff, T. G.; Whetten, R. L. Giant gold-glutathione cluster compounds: Intense optical activity in metal-based transitions. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (12), 2630-2641.
85. Bos, W.; Steggerda, J. J.; Yan, S. P.; Casalnuovo, J. A.; Mueting, A. M.; Pignolet, L. H. Separation of cationic metal cluster compounds by reversed-phase HPLC. *Inorg. Chem.* **1988**, *27* (5), 948-951.
86. Jimenez, V. L.; Leopold, M. C.; Mazzitelli, C.; Jorgenson, J. W.; Murray, R. W. HPLC of monolayer-protected gold nanoclusters. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (2), 199-206.
87. Song, Y.; Jimenez, V.; McKinney, C.; Donkers, R.; Murray, R. W. Estimation of size for 1-2 nm nanoparticles using an HPLC electrochemical detector of double layer charging. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (19), 5088-5096.
88. Song, Y.; Heien, M.; Jimenez, V.; Wightman, R. M.; Murray, R. W. Voltammetric detection of metal nanoparticles separated by liquid chromatography. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (17), 4911-4919.
89. Balasubramanian, R.; Guo, R.; Mills, A. J.; Murray, R. W. Reaction of Au-55(PPh₃)(12)Cl-6 with thiols yields thiolate monolayer protected Au-75 clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (22), 8126-8132.
90. Zhang, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Lo, C. K.; Paa, M. C.; Choi, M. M. F. Application of HPLC and MALDI-TOF MS for Studying As-Synthesized Ligand-Protected Gold Nanoclusters Products. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (4), 1676-1685.
91. Vilar-Vidal, N. Synthesis, characterization and properties of copper clusters. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
92. Vilar-Vidal, N.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. Size dependent catalytic activity of reusable sub-nanometer copper clusters. *ACS Catalysis* **2012**. (enviado).
93. Boyle, P.; Johnson, B.; Alexander, B.; Casalnuovo, J.; Gannon, P.; Johnson, S.; Larka, E.; Mueting, A.; Pignolet, L. H. Characterization of large cationic transition-metal-gold clusters by fast atom bombardment mass spectroscopy (FABMS). New rhenium-gold and platinum-gold clusters: [Au₄Re(H)₄[P(p-tol)₃]₂(PPh₃)₄]⁺, [Au₂Re₂(H)₆(PPh₃)₆]⁺, and [Au₆Pt(PPh₃)₇]²⁺. *Inorg. Chem.* **1987**, *26* (9), 1346-1350.
94. McNeal, C. J.; Winpenny, R. E. P.; Hughes, J. M.; Macfarlane, R. D.; Pignolet, L. H.; Nelson, L. T. J.; Gardner, T. G.; Irgens, L. H.; Vigh, G.; Fackler, J. P. CF-252-plasma desorption mass-spectrometry of gold

- clusters- fragmentation patterns in small clusters and differences in sample composition in large clusters. *Inorg. Chem.* **1993**, 32 (24), 5582-5590.
95. Schaaff, T. G. Laser desorption and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of 29-kDa Au:SR cluster compounds. *Anal. Chem.* **2004**, 76 (21), 6187-6196.
 96. Gies, A. P.; Hercules, D. M.; Gerdon, A. E.; Cliffel, D. E. Electrospray mass spectrometry study of tiopronin monolayer-protected gold nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (5), 1095-1104.
 97. Dass, A.; Stevenson, A.; Dubay, G. R.; Tracy, J. B.; Murray, R. W. Nanoparticle MALDI-TOF mass spectrometry without fragmentation: Au₂₅(SCH₂CH₂Ph)₁₈ and mixed monolayer Au₂₅(SCH₂CH₂Ph)_(18-x)(L)_x. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (18), 5940-5946.
 98. Dharmaratne, A. C.; Krick, T.; Dass, A. Nanocluster size evolution studied by mass spectrometry in room temperature Au₂₅(SR)₁₈ synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (38), 13604-13605.
 99. Fields-Zinna, C. A.; Sampson, J. S.; Crowe, M. C.; Tracy, J. B.; Parker, J. F.; deNey, A. M.; Muddiman, D. C.; Murray, R. W. Tandem mass spectrometry of thiolate-protected Au nanoparticles Na_xAu₂₅(SC₂H₄Ph)_{18-y}(S(C₂H₄O)₅CH₃)_y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (38), 13844-13851.
 100. Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17 (5), 337-366.
 101. Knochenmuss, R.; Zenobi, R. MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (2), 441-452.
 102. Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, 131 (9), 966-986.
 103. McCombie, G.; Knochenmuss, R. Enhanced MALDI ionization efficiency at the metal-matrix interface: Practical and mechanistic consequences of sample thickness and preparation method. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2006**, 17 (5), 737-745.
 104. Hotelling, A. J.; Nichols, W. F.; Giesen, D. J.; Lenhard, J. R.; Knochenmuss, R. Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: Factors influencing matrix and analyte ion intensities. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2006**, 12, 345-358.

105. Lai, E. P. C.; Owega, S.; Kulczycki, R. Time-of-flight mass spectrometry of bioorganic molecules by laser ablation of silver thin film substrates and particles. *J. Mass Spectrom.* **1998**, 33 (6), 554-564.
106. Spencer, M. T.; Furutani, H.; Oldenburg, S. J.; Darlington, T. K.; Prather, K. A. Gold nanoparticles as a matrix for visible-wavelength single-particle matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small biomolecules. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112 (11), 4083-4090.
107. Xu, S.; Li, Y.; Zou, H.; Qiu, J.; Guo, Z.; Guo, B. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (22), 6191-6195.
108. Bailes, J.; Vidal, L.; Ivanov, D.; Soloviev, M. Quantum dots improve peptide detection in MALDI MS in a size dependent manner. *Journal of Nanobiotechnology* **2009**, 7 (1), 10.
109. Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-Garcia, H. G.; Luftmann, H. The use of 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malonitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, 6, 49-52.
110. Vasil'ev, Y. V.; Khvostenko, O. G.; Streletskii, A. V.; Boltalina, O. V.; Kotsiris, S. G.; Drewello, T. Electron transfer reactivity in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI): Ionization energy, electron affinity and performance of the DCTB matrix within the thermochemical framework. *J. Phys. Chem. A* **2006**, 110 (18), 5967-5972.
111. W. Henderson, J. S. M. *Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds*. Willey: Chinchester, 2005; p 271.
112. McIndoe, J. S. Laser synthesis of transition metal clusters. *Transition Met. Chem.* **2003**, 28 (1), 122-131.
113. W. Henderson, J. S. M. *Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds*. Willey: Chinchester, 2005.
114. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **2000**, 72 (6), 1156-1162.
115. Makarov, A.; Denisov, E.; Lange, O.; Horning, S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ orbitrap hybrid mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2006**, 17 (7), 977-982.
116. Köcher, T.; Pichler, P.; Schutzbier, M.; Stingl, C.; Kaul, A.; Teucher, N.; Hasenfuss, G.; Penninger, J. M.; Mechtler, K. High precision

- quantitative proteomics using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: A new mass spectrometric method combining the benefits of all. *J. Proteome Res.* **2009**, 8 (10), 4743-4752.
117. *Voyager biospectrometry workstation user guide*. Applied biosystems: USA, 2000.
 118. Pankhurst, Q. A.; Thanh, N. K. T.; Jones, S. K.; Dobson, J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, 42 (22), 224001.
 119. Roca, A. G.; Costo, R.; Rebolledo, A. F.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Tartaj, P.; Gonzalez-Carreño, T.; Morales, M. P.; Serna, C. J. Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, 42 (22), 224002.
 120. Berry, C. C. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, 42 (22), 224003.
 121. Puentes, V. F.; Krishnan, K. M.; Alivisatos, P. Synthesis, self-assembly, and magnetic behavior of a two-dimensional superlattice of single-crystal epsilon-Co nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78 (15), 2187-2189.
 122. Dinega, D. P.; Bawendi, M. G. A solution-phase chemical approach to a new crystal structure of cobalt. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38 (12), 1788-1791.
 123. Sun, S. H.; Murray, C. B. Synthesis of monodisperse cobalt nanocrystals and their assembly into magnetic superlattices. *J. Appl. Phys.* **1999**, 85 (8), 4325-4330.
 124. Becker, J. A. S., R.; Festag, R.; Ruland, W.; Wendorff, J.H.; Pebler, J.; Quaiser, S.A.; Helbig, W.; Reetz, M.T. Electrochemical growth of superparamagnetic cobalt clusters. *J. Chem. Phys.* **1995**, 103 (7), 2520-2527.
 125. Ledo-Suarez, A.; Rodriguez-Sanchez, L.; Blanco, M. C.; Lopez-Quintela, M. A. Electrochemical synthesis and stabilization of cobalt nanoparticles. *Phys. Status Solidi A* **2006**, 203 (6), 1234-1240.
 126. Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. Mitsunobu and related reactions: Advances and applications. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (6), 2551-2651.
 127. Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981**, 1981 (01), 1,28.

128. Dubois, L. H.; Zegarski, B. R.; Nuzzo, R. G. Spontaneous organization of carboxylic acid monolayer films in ultrahigh vacuum. Kinetic constraints to assembly via gas-phase adsorption. *Langmuir* **1986**, 2 (4), 412-417.
129. Wu, N.; Fu, L.; Su, M.; Aslam, M.; Wong, K. C.; Dravid, V. P. Interaction of fatty acid monolayers with cobalt nanoparticles. *Nano Lett.* **2004**, 4 (2), 383-386.
130. Boczar, M.; Szczeponek, K.; Wójcik, M. J.; Paluszkievicz, C. Theoretical modeling of infrared spectra of benzoic acid and its deuterated derivative. *J. Mol. Struct.* **2004**, 700 (1-3), 39-48.
131. Stepanian, S. G.; Reva, I. D.; Radchenko, E. D.; Sheina, G. G. Infrared spectra of benzoic acid monomers and dimers in argon matrix. *Vib. Spectrosc* **1996**, 11 (2), 123-133.
132. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C.; A., H.; Martínez, R. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Masson, S.A.: Barcelona, 2002.
133. Nakamoto, K. *Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds*. John Wiley & Sons: New York, 1986.
134. Müller, U. *Inorganic structural chemistry*. 2 ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chinchester, 2006.
135. Finkelstein, D. A.; Mota, N. D.; Cohen, J. L.; Abruña, H. D. Rotating disk electrode (RDE) investigation of BH₄ and BH₃OH electro-oxidation at Pt and Au: Implications for BH₄ fuel cells. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113 (45), 19700-19712.
136. Houk, J.; Whitesides, G. M. Structure-reactivity relations for thiol-disulfide interchange. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109 (22), 6825-6836.
137. Polimbetova, G. S.; Aleshkova, M. M.; Bugubaeva, G. O.; Ibraimova, Z. U.; Borangazieva, A. K. Oxidative alkoxylation of hypophosphite in coordination sphere of iron(III). *Russ. J. Coord. Chem.* **2004**, 30 (6), 407-412.
138. Millis, K. K.; Weaver, K. H.; Rabenstein, D. L. Oxidation/reduction potential of glutathione. *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (15), 4144-4146.
139. Bard, A. J.; Parsons, R.; Jordan, J. *Standard potentials in aqueous solution*. Marcel Dekker: New York, 1985.
140. *Metals Handbook. Desk edition*. ASM International: 1998.

Epílogo

Cuando era pequeña quería ser escritora, una suerte de Rosalía de Castro en prosa, capaz navegar entre mundos fantásticos y conducir a lectores varios a través de los viajes más emocionantes. Creo recordar que en aquel entonces no sabía ni lo que era una tesis y menos aún que cuando por fin consiguiera escribir un libro este llevaría un título tan estrambótico como “Síntesis, propiedades y funcionalización de clústeres metálicos”. Años más tarde y con una formación científica a mis espaldas, sigo amando la literatura y además soy capaz de ver la poesía que se esconde tras un clúster, una molécula o una ruta sintética elegante. A parte de las decisiones propias, es inevitable el papel que tantas y tantas personas han jugado en que por fin haya podido escribir este libro y por eso ahora toca expresar mi gratitud.

Lo cierto es que toda esta andanza comenzó en el laboratorio de Antonio Mouriño, a él le tengo que agradecer que guiara mis primeros pasos en la investigación. Además, fue a través de él que conocí a quienes más tarde serían mis directores de tesis: Mercedes y Arturo, a ellos les agradezco que me hayan brindado la oportunidad de hacer esta tesis. Además, a Mercedes tengo que agradecerle que aceptara emprender este proyecto como mi tutora, a veces tan alejado de su campo, y a Arturo que siga confiando en mi tras casi diez años, es un placer poder seguir trabajando con él.

A M.Carmen tengo que agradecerle tantas cosas que no sé por dónde empezar. Recuerdo que fue la primera persona que conocí cuando empecé el proyecto de fin de carrera, Arturo estaba en Japón y ella me explicó en que iba a consistir mi trabajo. En ese momento no sabía que se acabaría convirtiendo en una gran amiga.

Gracias Olalla y Bea, de una forma u otra me han hecho avanzar a lo largo de la carrera poniendo el listón muy alto. Aunque nos separe el espacio y el tiempo siempre formareis parte de mi vida.

Tengo que dar unas gracias generales y enormes a todos los compañeros del CSIC y del FEDER. En particular a Mary quiero agradecerle que me diera el

coraje para empezar a escribir, a Silvina su amistad y su ayuda en mis primeros días porteños, a Cris que haya vuelto para poder conocerla más, a Puri porque desde que está en nuestras vidas todo resulta mucho más fácil, a todos los Carlos (Vázquez, Gregorio, Rodríguez) porque realmente de cada uno de ellos he aprendido algo, a Yolanda porque es la única persona que conozco que puede hacer que el magnetismo parezca fácil, a Rodrigo le agradezco que haya aprendido de mi, aunque sólo sea a ganchillar y como no, tengo que agradecer a Ana, Bea y Noelia que sean como son, sé que siempre podré contar con vosotras.

Gracias a toda la gente que conocí en Buenos Aires, hicieron que mi estancia allí no sólo fuera provechosa a nivel científico, si no también personal. Por su culpa una parte de mi alma se ha quedado allí, al otro lado del charco. No tengo palabras para agradecerle a Eli Jares-Erijman todo lo que ha significado en mi vida, la ciencia ha perdido una de las investigadoras más tenaces e inteligentes que he conocido.

También le agradezco a Ana Ledo que me haya abierto camino a lo largo de estos años. Parece que nuestras carreras transcurren paralelas desde que nos conocimos y espero que siga siendo así hasta el fin de los tiempos.

Gracias a Nanogap por muchas cosas, a parte de las muestras. La vi nacer como empresa y me enorgullece pensar que he puesto mi granito de arena.

Gracias a todos mis amigos, en especial a los de Ortigueira porque me conocen desde hace más tiempo del que recuerdo. A Eva, mi amiga eterna, le agradezco que tenga tanta paciencia conmigo. No te preocupes, aunque a veces no lo parezca, sigo aquí.

A Chema tengo que agradecerle muchas y muchas conversaciones sobre lo humano y lo divino.

Gracias a David, Sandra y Yaco, que contra expectativa han trascendido la etapa estudiantil. Pasan los años y ellos siguen mostrándome que tras cada colina hay un castro.

¡Ay! Susanita, sin ti Buenos Aires nunca hubiera sido lo que fue.

Tengo que agradecerles a Neal Stephenson, George R.R.Martin, Dan Simons, Orson Scott Card, Michael Moorcock las horas de entretenimiento, ya que al fin y al cabo algo habrán influido.

Gracias Andrés y Maite, si tuviera padrinos, sin duda seríais vosotros.

David, gracias por ser el factor aleatorio de la ecuación de mi vida. Si creyera en el destino, pensaría que algún ente superior te creó a mi imagen especular y semejanza. Porque sí, creo que ambos somos quirales y enantiómeros.

Por supuesto tengo agradecer a toda mi familia, tanto directa como política, además del cariño y el apoyo, que me hayan dado cultura, criterio y conocimiento. Cada uno en su parcela son las personas más inteligentes que conozco y gracias a ello han conseguido que siempre pretendiera llegar más alto para poder estar a su altura.

Muchas gracias a Federico, por la guía estética y formal, él reconcilia las ciencias y las letras como nadie, ¿para cuando unas “Nanologías”?

Muchísimas gracias a mis hermanas Iria y Xiana cuya inteligencia y sensibilidad serán siempre mi referente en la vida.

También gracias a Lois, que aunque ahora sea muy pequeño para leerlo algún día crecerá y podrá ver cómo su presencia vino a llenar de luz uno de los momentos más oscuros de nuestras vidas.

Gracias Nerio, por estar detrás de todo lo bueno que hay en mi, por no dejar que acabe desnutrida, por levantarme cuando me caigo, por ser más listo que yo y por ser, nada menos, que el amor de mi vida.

Gracias a mis padres. A Raquel, la luchadora por excelencia aunque ella no se lo crea y Pepiño dos contos, que aún cuando no está sigue presente en mis pensamientos. A ambos les debo lo que soy, no puedo imaginar unos mejores padres ni nadie mejor a quién parecerme.

En último lugar, no por menos importante si no por más frívolo, tengo que agradecer a la fundación Segundo Gil-Dávila y al Ministerio de Educación y Ciencia por haber financiado todos estos años de tesis e investigación.

